

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 970**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 31/4164** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 35/413** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2006 E 06705265 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1863520**

54 Título: **Uso de interleucina 17E para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

**08.03.2005 US 659857 P**  
**02.09.2005 US 713335 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.04.2015**

73 Titular/es:

**APTOSE BIOSCIENCES INC. (100.0%)**  
**2 Meridian Road**  
**Toronto, ON M9W 4Z7, CA**

72 Inventor/es:

**WRIGHT, JIM A.;**  
**YOUNG, AIPING H.;**  
**LEE, YOON y**  
**CAO, MING YU**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 533 970 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de interleucina 17E para el tratamiento de cáncer

## 5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de la terapéutica del cáncer y en particular con el uso de interleucina 17E para el tratamiento de cáncer.

## 10 Antecedentes de la invención

Las citocinas son una gran familia de más de 160 proteínas solubles de señalización intercelular involucradas en la regulación del sistema inmune. La IL-17E (IL-25) pertenece a una familia de citocinas que posee homología con IL-17 (Aggarwal y otros, (2002) *J. Leukoc Biol* 71: 1-8; y Hurst y otros, (2002) *J Immunol* 169: 443-453). La familia de citocinas de la interleucina 17 comparte un pliegue tipo nudo de cisteína conservado cercano al C-terminal. Todos los miembros de la familia de la interleucina 17, excepto la interleucina 17B, son dímeros unidos por puentes disulfuro. Las proteínas de interleucina 17E de una variedad de especies comparten una significativa identidad de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la interleucina 17E humana madura comparte un 76% de identidad con la interleucina 17E madura de ratón. Se han identificado varias isoformas de interleucina 17E humana que comparten una homología significativa (Kim y otros, (2002) *Blood* 100: 2330-2340; Lee y otros, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:1660-1664 y Fort y otros (2001) *Immunity* 15:985-995).

Aunque la IL-17E se relaciona estructuralmente con la IL-17, sus efectos biológicos difieren dramáticamente de los descritos para la IL-17 y otras 17E de la familia IL-17. La expresión de IL-17E en ratones resulta en la expansión de eosinófilos a través de la producción de IL-5 a partir de una población no identificada que no es de células T (Hurst y otros, (2002) *J Immunol* 169: 443-453; Pan y otros, (2001) *J Immunol* 167: 6559-6567; y Fort y otros, (2001) *Immunity* 15: 985-995). Además, la IL-17E induce una expresión génica elevada de IL-4 e IL-13 en múltiples tejidos, y la respuesta inmune resultante tipo T helper 2 (T<sub>H</sub>2) que manifiesta un aumento de los niveles de inmunoglobulina E (IgE) en suero y cambios patológicos en los pulmones y tracto digestivo con infiltrados eosinófilos, aumenta la producción de moco, y la hiperplasia de las células epiteliales (Hurst y otros, (2002) *J Immunol* 169: 443-453; Pan y otros, (2001) *J Immunol* 167: 6559-6567; y Fort y otros, (2001) *Immunity* 15: 985-995), lo que indica que IL-17E es capaz de amplificar las respuestas inflamatorias.

Aunque se demostró que el ARNm de IL-17E se expresa en células T<sub>H</sub>2 polarizadas (Fort y otros, (2001) *Immunity* 15: 985-995), se detectó además el ARNm de IL-17E en múltiples tejidos, que incluyen colon, útero, estómago, intestino delgado, riñón y pulmón (Hurst y otros, (2002) *J Immunol* 169: 443-453; Pan y otros, (2001) *J Immunol* 167: 6559-6567; y Fort y otros, (2001) *Immunity* 15: 985-995), lo que sugiere que además de las células T<sub>H</sub>2, otros tipos de célula pueden producir IL-17E. Los mastocitos derivados de la médula ósea son capaces, además, de producir IL-17E tras el entrecruzamiento con IgE, por lo tanto, la IL-17E derivada de mastocitos puede estar implicada en el aumento de las respuestas inmunes de tipo T<sub>H</sub>2 (Ikeda y otros, (2003) *Blood* 101: 1341-1346).

Se ha descrito la identificación de polipéptidos que tienen similitud de secuencia con la interleucina-17, que incluyen dos isoformas de IL-17E, y sus usos terapéuticos. Por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 6,579,520, y 6,569,645, y solicitudes de patente de los Estados Unidos núms. 20040043397; 20030203451; 20030199044; 20030186306; 20030180255; 20030054442; 20030008815; 20030003546; 20020182673 y 20020177188 describen una familia de polipéptidos, que incluyen interleucina 17E, con una identidad de secuencia con los receptores de interleucina 17, así como también con interleucina 17 y las moléculas de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos. Se ha demostrado que la familia de polipéptidos estimula la proliferación/activación de células T y, por lo tanto, se especula que pueden ser útiles como adyuvantes para estimular la proliferación/activación de células T contra antígenos tumorales y de esta manera promover una respuesta antitumoral. Sin embargo, no se han proporcionado datos experimentales que demuestren el efecto inmunoadyuvante de estos polipéptidos.

En contraste directo con las enseñanzas de las patentes y solicitudes de patentes indicadas anteriormente, las solicitudes de patente de los Estados Unidos núms. 20050074427; 20050048029; 20050003451; 20030124092; 20020037524 describen una función potencial de los polipéptidos tipo interleucina 17 en la progresión de cánceres tales como linfoma y sugiere el uso de antagonistas a los polipéptidos tipo interleucina 17 para el tratamiento de afecciones cancerosas o linfoma.

Las solicitudes de patente de los Estados Unidos núms. 20050064391; 20040241137; 20040126357; 20040091503; 20040180389; 20040151728; 20040170960; 20040142889; 20040126793 y 20040122217 describen composiciones de lectina y métodos para usar las mismas para modular una respuesta inmune a un antígeno. Las composiciones comprenden

un objetivo que porta un antígeno y un polipéptido de fusión que comprende una primera parte que es capaz de unirse a un carbohidrato y una segunda parte que es capaz de unirse a una célula. La segunda parte del polipéptido de fusión es un ligando, tal como un ligando para un receptor de citocinas, CD40, una molécula de adhesión, un receptor de defensina, un receptor de proteína de choque térmico, una molécula coestimuladora de células T, o un contrarreceptor para una molécula coestimuladora de células T. Los ligandos ilustrativos de receptores de citocinas descritos en estas solicitudes incluyen varias interleucinas, entre las cuales la IL-25 se contempla como una opción. Mientras los métodos descritos en estas solicitudes incluyen métodos para modular una respuesta inmune, tratar una enfermedad o reducir el número de metástasis en un sujeto, estas solicitudes de patentes no proporcionan ningún dato experimental que demuestre la actividad antitumoral de las composiciones descritas.

Esta información de los antecedentes se proporciona con el propósito de dar la información conocida que el solicitante considera de posible importancia para la presente invención. No se pretende ninguna admisión necesariamente, ni debería interpretarse que ninguna de la información precedente constituye materia anterior en contra de la presente invención.

Breve descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un uso de la interleucina 17E para el tratamiento del cáncer. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto, dicha composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicho polipéptido de IL-17E se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento tumoral.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un producto de combinación para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto, dicho producto de combinación comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E y una o más terapias contra el cáncer, en donde dicho polipéptido de IL-17E se proporciona en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento tumoral.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E en combinación con una o más terapias contra el cáncer para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E en la fabricación de un medicamento para la inhibición del crecimiento tumoral.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto al aumentar los niveles de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) en dicho sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto al aumentar los niveles de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) en dicho sujeto en combinación con la administración de una o más terapias contra el cáncer a dicho sujeto.

Breve descripción de las figuras

Estas y otras características de la invención serán más evidentes en la siguiente descripción detallada en la cual se hace referencia a las figuras anexas.

La **Figura 1** representa cambios en la expresión de proteínas en suero recogido de ratones desnudos CD-1 que portan células tumorales de melanoma humano, tratados con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) (Figura 1A) o PBS (Figura 1B), y la identificación de la expresión de IL-17E (Figura 1C).

La **Figura 2** representa diferencias en la expresión de interleucina 17E en los sueros de ratones desnudos CD-1 que portan células tumorales de melanoma humano, tratados con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) o PBS.

La **Figura 3** representa la expresión de interleucina 17E en esplenocitos aislados de ratones C57BL/6 tratados con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) *in vitro* con respecto a esplenocitos tratados con PBS.

5

La **Figura 4** representa la expresión de interleucina 17E en células B (Figura 4A) y en células T (Figura 4B) aisladas de bazos recolectados de ratones C57BL/6 y con o sin el tratamiento *in vitro* con la composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM).

10

La **Figura 5** representa la expresión de interleucina 17E en células B aisladas de bazos recolectados de ratones desnudos CD-1 que portan tumores de melanoma humano, tratados con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM).

15

La **Figura 6** representa la detección de células B esplénicas activadas aisladas de ratones desnudos CD-1 que portan tumores de melanoma humano tratados con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM), por ciento de IgM positivas (Figura 6A) y

por ciento de IgM, CD80 y CD86 positivas (Figura 6B).

20

La **Figura 7** representa la detección de eosinófilos CCR3 positivos en sangre periférica aislada de ratones desnudos CD-1 que portan tumores de melanoma humano, tratados con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM).

25

La **Figura 8** representa la identificación histoquímica de la infiltración de eosinófilos en tumores extraídos de ratones desnudos CD-1 que portan tumores de melanoma humano, tratados con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM).

30

La **Figura 9** representa la expresión de la proteína básica principal (MBP) (Figura 9A) y la peroxidasa de eosinófilos (EPO) (Figura 9B) en tumores aislados de ratones desnudos CD-1 que portan tumores de melanoma humano tratados con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM).

35

La **Figura 11** representa los efectos de la interleucina 17E humana sobre el crecimiento tumoral del melanoma humano (C8161).

40

La **Figura 12** representa los efectos de la interleucina 17E murina sobre el (A) volumen del tumor y (B) peso del tumor en ratones que portan xenoinjertos pancreáticos humanos (MiaPaCa2).

La **Figura 13** representa el efecto antitumoral de dosis respuesta de la interleucina 17E humana sobre el crecimiento tumoral del melanoma humano (C8161).

45

La **Figura 14** representa los efectos de la interleucina 17E sola y en combinación con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) sobre el (A) peso del tumor y el (B) volumen del tumor en ratones que portan xenoinjertos de melanoma humano C8161.

La **Figura 15** representa los efectos de la interleucina 17E sola y en combinación con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) sobre el número de eosinófilos en la sangre de ratones que portan xenoinjertos de melanoma humano C8161.

5 La **Figura 16** representa los efectos de la interleucina 17E sola y en combinación con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) sobre el número de eosinófilos en el bazo de ratones que portan xenoinjertos de melanoma humano C8161.

10 La **Figura 17** representa la infiltración de eosinófilos en tumores de melanoma humano C8161 en respuesta al tratamiento con PBS o con una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM), sola o en combinación con la interleucina 17E. (A) Representa micrografías representativas y (B) representa el número de eosinófilos por milímetro cuadrado de tejido tumoral.

15 La **Figura 18** representa los efectos de la interleucina 17E sola o en combinación con dacarbazina (DTIC) sobre el (A) volumen del tumor y el (B) peso del tumor en ratones que portan xenoinjertos de melanoma humano (C8161).

La **Figura 19** representa los efectos de la interleucina 17E sola o en combinación con cisplatino sobre xenoinjertos de cáncer de ovario humano (SK-OV-3).

20 La **Figura 20** representa los efectos de la interleucina 17E sola o en combinación con Taxotere o Tarceva sobre el (A) volumen del tumor y el (B) peso del tumor en ratones desnudos atímicos CD-1 que portan xenoinjertos tumorales de cáncer de pulmón humano (H460).

25 La **Figura 21** representa los efectos de la interleucina 17E sola o en combinación con CPT-11 o Avastina sobre el (A) volumen del tumor y el (B) peso del tumor en ratones desnudos atímicos CD-1 que portan xenoinjertos de cáncer de colon humano (HT-29).

30 La **Figura 22** representa el efecto del tratamiento con interleucina 17E sobre los niveles de IL-5 en suero en ratones con implantes tumorales de (A) melanoma humano C8161 y (B) cáncer pancreático humano MiaPaCa2.

La **Figura 23** representa el efecto de la interleucina 17E sobre los números de eosinófilos esplénicos y los números y activación de células B. (A) representa el porcentaje de eosinófilos esplénicos; (B) representa el porcentaje de células B esplénicas y (C) la proporción de células B activadas.

35 La **Figura 24** representa el efecto de la interleucina 17E sobre (A) los números de células B esplénicas y (B) la activación.

40 La **Figura 25** representa el efecto antitumoral de la interleucina 17E murina cuando se administra ya sea (A) por vía intraperitoneal o (B) por vía intravenosa a ratones desnudos atímicos CD-1 que portan xenoinjertos tumorales de melanoma humano (C8161).

45 La **Figura 26** representa curvas de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que muestran la unión al receptor de la interleucina 17E humana (A) y la interleucina 17E murina (B) al receptor de interleucina 17E murina en la línea de células pre-B 70Z/3. Las flechas indican células que se han teñido como positivas a interleucina 17E. Las células teñidas sin preincubación con interleucina 17E (controles negativos) se indican por las curvas de líneas finas.

50 La **Figura 27** representa el efecto antitumoral de muestras de interleucina 17E humana y murina inmunorreducidas sobre (A) el volumen del tumor y (B) el peso del tumor en ratones atímicos CD-1 que portan xenoinjertos de cáncer pancreático humano MiaPaCa2.

La **Figura 28A** representa una membrana de Western que muestra la inducción de la fosforilación de BLNK en la línea celular de linfoma de células B WEHI-231 después de una exposición *in vitro* a interleucina 17E humana (hIL-17E) o murina (interleucina 17E (mIL-17E)). Se indican los tiempos de exposición (0, 2, 5 minutos). La flecha indica a BLNK fosforilado (p-BLNK). Se muestran los marcadores de peso molecular en kilodalton (kD). Se muestra que los niveles de GAPDH indican una carga equivalente entre los carriles (Figura 28B). La Figura 28C representa una membrana de Western que muestra la inducción de la fosforilación de Lyn en la línea celular de linfoma de células B WEHI-231 después de una exposición *in vitro* a interleucina 17E humana (hIL-17E) o interleucina 17E murina (mIL-17E). Se indican los tiempos de exposición (0, 2, 5 minutos). La flecha indica a Lyn fosforilada (p-Lyn) en el peso molecular esperado de aproximadamente 56 kD. Se muestra que los niveles de GAPDH indican una carga equivalente entre los carriles (Figura 28D).

La **Figura 29** representa coimmunoprecipitación de Lyn e IL17BR en la línea celular de linfoma de células B WBHI 231 después de la exposición a interleucina 17E humana. Se indican los tiempos de exposición (0 y 5 minutos). Las flechas indican a Lyn fosforilada (p-Lyn; Figura 29A), IL17BR (Figura 29B) y la proteína Lyn total (Figura 29C). Se muestran los marcadores de peso molecular en kilodalton (kD).

La **Figura 30A** representa aumento de los niveles del IkappaB fosforilado (p-IkB; indicado por la flecha) en la línea celular de linfoma de células B WEHI 231 después de la exposición a interleucina 17E humana o interleucina 17E murina. Se indican los tiempos de exposición (0, 2, 5 minutos). Se muestra que los niveles de GAPDH indican una carga equivalente entre los carriles (Figura 30B).

La **Figura 31** proporciona la secuencia para un polipéptido de interleucina 17E murina (Acceso al GenBank núm. NP\_542767)[sec. con núm. de ident.:7].

La **Figura 32** proporciona la secuencia para un precursor de polipéptido de la interleucina 17E humana (Acceso al GenBank núm. Q9H293) [sec. con núm. de ident.:1].

La **Figura 33** proporciona la secuencia para un precursor de polipéptido de la interleucina 17E humana (Acceso al GenBank núm. AAN39038) [sec. con núm. de ident.:2].

La **Figura 34** proporciona la secuencia para un polipéptido de interleucina 25 humana (Acceso al GenBank núm. AAL57622) [sec. con núm. de ident.:3].

La **Figura 35** proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de interleucina 17E murina (Acceso al GenBank núm. NM\_080729) [sec. con núm. de ident.:8].

La **Figura 36** proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de polipéptido de la interleucina 17E humana (Acceso al GenBank núm. AF305200) [sec. con núm. de ident.:4].

La **Figura 37** proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica un precursor de polipéptido de la interleucina 17E humana (Acceso al GenBank núm. AF461739) [sec. con núm. de ident.:5].

La **Figura 38** proporciona la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la interleucina 25 humana (Acceso al GenBank núm. AF458059) [sec. con núm. de ident.:6].

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de la interleucina 17E (conocida además como interleucina 25) para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Como se describió anteriormente, informes previos de una familia de polipéptidos relacionados con la IL-17 describieron la capacidad de estos polipéptidos (que incluyen una isoforma de la interleucina 17E) para estimular la proliferación/activación de células T y han especulado que los polipéptidos pueden ser útiles como adyuvantes para aumentar la eficacia de agentes quimioterapéuticos estándar mediante la estimulación de una respuesta de células T.

Sin embargo no se han proporcionado datos experimentales relacionados con este efecto inmunoadyuvante antitumoral propuesto.

Por el contrario, la presente invención proporciona datos *in vivo* que demuestran que la interleucina 17E como agente único es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas y, además, que este efecto contra el cáncer es independiente de la activación de células T. Como se muestra en los Ejemplos proporcionados en la presente, este efecto inhibitorio de la interleucina 17E sobre el crecimiento tumoral se demostró inicialmente por estimulación de la producción endógena de interleucina 17E en ratones desnudos deficientes de células T. Se demostró que la administración de interleucina 17E exógena a ratones desnudos tiene el mismo efecto y tanto la interleucina 17E endógena como exógena aumentaron la infiltración de eosinófilos en el tumor. La capacidad de la interleucina 17E para inhibir el crecimiento tumoral en ausencia de una respuesta de células T indica que la interleucina 17E tiene amplia utilidad como agente contra el cáncer.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método de inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto al aumentar los niveles de interleucina 17E en el sujeto. Los niveles de interleucina 17E pueden aumentarse al administrar interleucina 17E exógena al sujeto, en la forma de un polipéptido de interleucina 17E o un polinucleótido que codifica un polipéptido de interleucina 17E. La presente invención proporciona además un método para estimular la infiltración de eosinófilos a un tumor, y de esta manera inhibir el crecimiento del tumor, al aumentar los niveles de interleucina 17E en un sujeto. Los métodos de la presente invención son aplicables ampliamente a una variedad de pacientes con cáncer, que incluye pacientes inmunocomprometidos con bajos niveles de células T.

Como se demuestra en la presente, la interleucina 17E es capaz de inhibir el crecimiento tumoral *in vivo* ya sea como un agente único, o en combinación con una terapia contra el cáncer. Por lo tanto la presente invención proporciona además el uso de la interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto. La interleucina 17E puede proporcionarse al sujeto exógenamente, como un polipéptido de interleucina 17E o un polinucleótido que codifica un polipéptido de interleucina 17E, o puede proporcionarse al estimular la producción de interleucina 17E endógena. Las terapias contra el cáncer contempladas en la presente invención incluyen, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos estándar, agentes inmunoterapéuticos, radiación, terapia génica, manipulación hormonal y terapia antisentido.

### Definiciones

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención.

Los términos "terapia" y "tratamiento," como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a una intervención realizada con la intención de aliviar los síntomas asociados con, prevenir el desarrollo de, o alterar la patología de un cáncer. Por lo tanto, los términos terapia y tratamiento se usan en el sentido más amplio, e incluyen la prevención (profilaxis), moderación, reducción, estabilización o cura de un cáncer en varias etapas. Aquellos con necesidad de terapia/tratamiento incluyen los que ya tienen cáncer así como los propensos, o en riesgo de desarrollar cáncer y aquellos en los que el cáncer debe prevenirse.

Un "inductor de la interleucina-17E", como se usa en la presente, se refiere a un compuesto, composición o tratamiento que induce o estimula directa o indirectamente la producción endógena de interleucina 17E y/o la liberación de interleucina 17E en un sujeto.

Una "terapia contra el cáncer", como se usa en la presente, es un compuesto, composición o tratamiento que evita o demora el crecimiento y/o metástasis de células cancerosas. Tales terapias contra el cáncer incluyen, pero sin limitarse a, tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, radiación, terapia génica, manipulación hormonal, inmunoterapia y terapia antisentido con oligonucleótidos.

El término "sujeto" o "paciente," como se usa en la presente, se refiere a un mamífero con necesidad de tratamiento.

El término "aliviar" incluye el cese, prevención, disminución, o mejora de uno o más síntomas, signos, y características del cáncer que se trata, tanto temporalmente como a largo plazo.

El término "inhibir", como se usa en la presente, significa disminuir, reducir, enlentecer o evitar.

La administración de un compuesto "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales, pretende incluir la

administración simultánea (concurrente) y la administración consecutiva. La administración consecutiva pretende abarcar varios órdenes de administración de la interleucina 17E y de una o más terapias contra el cáncer al sujeto.

5 El término "polipéptido" se usa en la presente como un término genérico para referirse a una secuencia de aminoácidos de al menos 20 aminoácidos de longitud que puede ser una secuencia de proteína de tipo silvestre (de origen natural), un fragmento de una secuencia de proteína de tipo silvestre, una variante de una secuencia de proteína de tipo silvestre, un derivado de una secuencia de proteína de tipo silvestre, o un análogo de una secuencia de proteína de tipo silvestre. Por lo tanto, las secuencias y fragmentos de proteínas nativas, variantes, derivados y análogos de secuencias de proteínas nativas, como se definen en la presente, se consideran especies del género de los polipéptidos.

10 El término "polipéptido aislado," como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que en virtud de su origen no está asociado con otros polipéptidos con los cuales se asocia normalmente por naturaleza, y/o se aísla a partir de la célula en la cual se produce normalmente, y/o está libre de otros polipéptidos de la misma fuente celular, y/o es expresado por una célula de una especie diferente, y/o no se produce naturalmente.

15 "De origen natural" como se usa en la presente descripción, tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, la secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (se incluyen los virus) que se pueden aislar a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

20 Los siguientes términos se usan en la presente para describir las relaciones de secuencias entre dos o más polipéptidos: "secuencia de referencia," "ventana de comparación," "identidad de secuencia" y "por ciento de identidad de secuencia." Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de una proteína en toda su extensión, o puede comprender una secuencia completa de una proteína. Generalmente, una secuencia polipeptídica de referencia es de al menos 7 aminoácidos de longitud y frecuentemente de al menos 17 aminoácidos de longitud.

30 Una "ventana de comparación", como se usa en la presente, se refiere a un segmento conceptual de la secuencia de referencia de al menos 5 posiciones de aminoácidos contiguos sobre los cuales puede compararse una secuencia candidata con la secuencia de referencia y en donde la porción de la secuencia candidata en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (*es decir* huecos) de 20 por ciento o menos cuando se compara con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. La presente invención contempla varias longitudes para la ventana de comparación, hasta y que incluye toda la extensión ya sea de la secuencia de referencia o la candidata. La alineación óptima de las secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el uso del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. (1981) 2:482), el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (1970) 48:443), la búsqueda para el método de similitud de Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) (1988) 85:2444), mediante el uso de aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de programas informáticos Wisconsin Genetics versión 7.0, Grupo de Computación en Genética, 573 Science Dr., Madison, WI), mediante el uso de programas de computación disponibles públicamente tal como ALIGN o Megalign (DNASTAR), o mediante inspección. Después se selecciona la mejor alineación (*es decir* que resulta en el mayor porcentaje de identidad en la ventana de comparación).

45 El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polipéptidos son idénticas (*es decir* sobre una base de aminoácido por aminoácido) en la ventana de comparación.

50 El término "porcentaje (%) de identidad de secuencia," como se usa en la presente descripción con respecto a una secuencia de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de la secuencia polipeptídica de referencia en una ventana de comparación después de alinear óptimamente las secuencias e introducir interrupciones, si necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia, sin considerar cualquiera de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia.

55 Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a una variación de +/-10% del valor nominal. Debe entenderse que tal variación siempre se incluye en cualquier valor dado proporcionado en la presente, ya sea que se refiera específicamente o no.

Interleucina 17E



En el contexto de la presente invención, la interleucina 17E para el tratamiento del cáncer puede proporcionarse como un polipéptido o como un polinucleótido que codifica y es capaz de expresar el polipéptido de interleucina 17E.

5 Polipéptidos de interleucina 17E

En la técnica se conoce que varias isoformas de la interleucina 17E (IL-17E; conocida además como IL-25) se producen en la naturaleza. Las isoformas, aunque poseen una identidad de secuencia significativa, exhiben diferencias tanto en el extremo N- como en el C-terminal. Adicionalmente, se han observado diferencias en los patrones de expresión de las varias isoformas (Kim y otros, Blood 100: 2330-2340, 2002). La presente invención contempla el uso de las varias isoformas conocidas de la interleucina 17E para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral.

En la técnica se conocen las secuencias de aminoácidos de varias isoformas de la interleucina 17E (ver, por ejemplo, Lee y otros, J. Biol. Chem. 276: 1660-1664, 2001; Kim y otros, Blood 100:2330-2340; Fort y otros, Immunity 15:985-995, 2001; patentes de los Estados Unidos núms. 6,579,520 y 6,569,645; solicitudes de patente de los Estados Unidos núms. 20050074427, 20050048029, 20050003451, 20030124092, 20020037524, 20040043397, 20030203451, 20030199044, 20030186306, 20030180255, 20030054442, 20003008815, 20030003546, 20020182672 y 20020177188). Las secuencias de aminoácidos de varias isoformas de la interleucina 17E humana están disponibles, además, en la base de datos GenBank mantenida por el NCBI (por ejemplo, Acceso al GenBank núms. AAG40848, Q9H293 y NP\_073626 (precursor de la isoforma 1 de la interleucina-17E; sec. con núm. de ident.:1); AAN39038 y NP\_758525 (interleucina 17E, precursor de la isoforma 2; sec. con núm. de ident.:2), y AAL57622 (interleucina 25; sec. con núm. de ident.:3)) y se proporcionan en la presente como las Figuras 32-34, respectivamente. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican varias isoformas de la interleucina 17E humana están disponibles, además, en el GenBank (Acceso al GenBank núms. AF305200 y NM\_022789 (interleucina 17E, variante transcripcional 1; sec. con núm. de ident.:4); AF461739 y NM\_172314 (interleucina 17E, variante transcripcional 2; sec. con núm. de ident.:5) y AF458059 (ARNm de la interleucina 25; sec. con núm. de ident.:6)) y se proporcionan en la presente como las Figuras 32-34. Similarmente, la secuencia de aminoácidos para la interleucina 17E murina está disponible en el GenBank (NP\_542767 y AAL57623 (interleucina 17E (interleucina 25): sec. con núm. de ident.:7)), junto con la correspondiente secuencia de ácido nucleico (NM\_080729 y AF458060, respectivamente (sec. con núm. de ident.:8)). La secuencia de aminoácidos para la interleucina 17E murina se proporciona en la presente como la Figura 31 y la secuencia de ácido nucleico que codifica la interleucina 17E murina se proporciona en la presente como la Figura 35.

La presente invención contempla el uso de la interleucina 17E de varias especies para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral. Por lo tanto una modalidad de la presente invención proporciona el uso de una interleucina 17E humana para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de una interleucina 17E murina para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral.

La interleucina 17E se produce *in vivo* como una proteína precursora que contiene un péptido señal que posteriormente se escinde para producir la proteína madura. En la técnica se conoce que la longitud del péptido señal varía con las diferentes isoformas de la interleucina 17E. Por ejemplo, la proteína precursora de la isoforma de interleucina 17E humana identificada por Lee y otros, ((2001) J. Biol.Chem. 276(2):1660-1664 (Acceso al GenBank núm. Q9H293)) tiene 177 residuos de aminoácido de longitud y comprende un péptido señal residuo de 32 aminoácidos, mientras que la proteína precursora de la isoforma de interleucina 17E humana identificada por Kim y otros, ((2002) Blood. 100:2330-2340 (Acceso al GenBank núm. AAN39038)) tiene 161 residuos de aminoácido de longitud y comprende un péptido señal residuo de 16 aminoácidos. La proteína precursora de la interleucina 17E murina (Fort y otros, (2002) Immunity 15:985-995 (Acceso al GenBank núm. NP\_542767)) tiene 169 residuos de aminoácido de longitud y comprende un péptido señal residuo de 16 aminoácidos. La presente invención contempla el uso ya sea de la forma precursora de la interleucina 17E (es decir la proteína de interleucina 17E en toda su extensión) o la forma madura de la interleucina 17E o una combinación de estas para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral. Una modalidad de la presente invención proporciona el uso de la forma madura de una interleucina 17E humana. En otra modalidad de la presente invención, la interleucina 17E humana tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1, 2 o 3. En otra modalidad de la presente invención, la interleucina 17E humana tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 1, a partir del aminoácido 33 al 177. En otra modalidad de la presente invención, la interleucina 17E humana tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 2, a partir del aminoácido 17 al 169. Otra modalidad de la presente invención, proporciona el uso de la forma madura de una interleucina 17E murina. En una modalidad adicional, la interleucina 17E murina tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la sec. con núm. de ident.: 7.

5 Como apreciará un experto en la técnica, una preparación sustancialmente pura de interleucina 17E madura puede contener pequeñas cantidades de proteína precursora. Similarmente, las preparaciones sustancialmente puras de la interleucina 17E precursora pueden contener pequeñas cantidades de proteína madura. Tales preparaciones sustancialmente puras de interleucina 17E madura o de interleucina 17E precursora también son adecuadas para su uso en la presente invención.

10 Además de las formas en toda su extensión y las formas maduras de los polipéptidos de interleucina 17E de origen natural, para los propósitos de la presente invención los polipéptidos de interleucina 17E incluyen además fragmentos o variantes biológicamente activos de los polipéptidos de la interleucina 17E de origen natural, así como análogos, derivados o peptidomiméticos de los polipéptidos de la interleucina 17E de origen natural o dichos fragmentos o variantes biológicamente activos.

15 Por ejemplo, en la técnica se conoce que los fragmentos de un polipéptido pueden retener la función de la forma del polipéptido de origen natural. Como se usa en la presente, un fragmento biológicamente activo es un fragmento del polipéptido de origen natural (o de tipo silvestre) que retiene sustancialmente la misma actividad que el polipéptido de tipo silvestre. Los fragmentos típicamente son de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. En una modalidad de la presente invención, los fragmentos son de al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En otra modalidad, los fragmentos son de al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud. En una modalidad adicional, los fragmentos son de al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud. En otra modalidad, los fragmentos son de al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud. El término "fragmento" abarca además los polipéptidos correspondientes a la proteína de tipo silvestre que contienen una delección de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos a partir del N-terminal, a partir del C-terminal o a partir de tanto el N- como el C-terminales de la secuencia de tipo silvestre. Los fragmentos candidatos pueden seleccionarse a partir de fragmentos aleatorios generados de la proteína de origen natural o pueden diseñarse específicamente. La actividad de los fragmentos se prueba y se compara con la del polipéptido de tipo silvestre y se seleccionan aquellos fragmentos con, sustancialmente la misma actividad que la del polipéptido de tipo silvestre.

25 Una variante de polipéptido es una en la cual uno o más residuos de aminoácidos se han eliminado, añadido o sustituido por los que aparecen en la secuencia de aminoácidos del correspondiente polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En el contexto de la presente invención, una variante retiene además sustancialmente la misma actividad que la del polipéptido de interleucina 17E de origen natural. De acuerdo con una modalidad de la presente invención, una variante tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80% idéntica al correspondiente polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En otra modalidad, una variante tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica al correspondiente polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En otras modalidades, una variante tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica al correspondiente polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En una modalidad adicional, el polipéptido de interleucina 17E de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 1, 2, 3 o 7.

30 Típicamente, cuando una variante contiene una o más sustituciones de aminoácidos estas son sustituciones "conservadoras". Una sustitución conservadora implica el remplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo que tiene similares propiedades de la cadena lateral. Como se conoce en la técnica, los veinte aminoácidos de origen natural pueden agruparse de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas de sus cadenas laterales. Agrupaciones adecuadas incluyen alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, metionina, fenilalanina y triptófano (cadenas laterales hidrófobas); glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina (cadenas laterales sin carga, polares); ácido aspártico y ácido glutámico (cadenas laterales ácidas) y lisina, arginina e histidina (cadenas laterales básicas). Otra agrupación de aminoácidos es fenilalanina, triptófano, y tirosina (cadenas laterales aromáticas). Una sustitución conservadora implica la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido del mismo grupo.

35 Como se conoce en la técnica, los análogos y derivados de polipéptidos de origen natural, y los compuestos peptidomiméticos en base a la secuencia de un polipéptido de origen natural pueden tener ventajas sobre la forma de origen natural, que incluyen, por ejemplo, mayor estabilidad química, aumento de la resistencia a la degradación proteolítica, mejores propiedades farmacológicas (tales como, tiempo de vida media, absorción, potencia y eficacia), modificación de la especificidad (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas) y/o reducción de la antigenicidad. Por lo tanto la presente invención contempla además el uso de análogos y derivados de la interleucina 17E, y compuestos peptidomiméticos en base a la interleucina 17E para tratar el cáncer y/o inhibir el crecimiento tumoral.

50 En el contexto de la presente invención, un "derivado" es un polipéptido que contiene porciones químicas o bioquímicas adicionales que normalmente no son parte de una secuencia de origen natural. Los derivados incluyen polipéptidos en los cuales el amino-terminal y/o el carboxilo-terminal y/o una o más cadenas laterales de aminoácidos se han derivado con un

grupo químico sustituyente adecuado, así como polipéptidos cíclicos, duales y multiméricos, polipéptidos fusionados a otras proteínas o vehículos, polipéptidos glicosilados o fosforilados, polipéptidos conjugados a porciones lipofílicas (por ejemplo, porciones caproilo, laurilo, estearoilo) y polipéptidos conjugados a un anticuerpo u otros ligandos biológicos.

5 Los ejemplos de grupos químicos sustituyentes que pueden usarse para derivar polipéptidos incluyen, pero sin limitarse a, grupos alquilo, cicloalquilo y arilo de cadena corta (por ejemplo 1-10 carbonos); grupos acilo, que incluyen grupos alcanilo y aroilo de cadena corta (por ejemplo 1-10 carbonos); ésteres; amidas; halógenos; hidroxilos; carbamilos, y similares. El grupo sustituyente puede ser además un grupo de bloque tal como Fmoc (fluorenimetil-O-CO-), carbobenzoxi (benzil-O-CO-), monometoxisuccinil, naftil-NH-CO-, acetilamino-caproil y adamantil-NH-CO-. Otros derivados incluyen derivados  
10 hidroximetilo C-terminal, derivados O-modificados (por ejemplo, hidroximetil benzil éter C-terminal) y derivados modificados en el N-terminal que incluyen amidas sustituidas tales como alquilamidas e hidrazidas.

El término polipéptido "cíclico" se refiere a un derivado cíclico de un polipéptido al cual, por ejemplo, se han añadido dos o más residuos de aminoácidos adicionales adecuados para la formación de ciclos. Estos aminoácidos adicionales pueden  
15 añadirse al carboxilo terminal y al amino terminal, o pueden estar en posiciones internas.

Alternativamente, un polipéptido cíclico puede tener ventaja sobre residuos de cisteína de origen natural en la secuencia de aminoácidos para formar un enlace disulfuro y de esta manera formar un polipéptido cíclico. Un polipéptido cíclico puede  
20 contener un enlace disulfuro intramolecular, *por ejemplo*, -S-S-; un enlace amida intramolecular entre los dos residuos añadidos, *es decir*, -CONH- o -NHCO-; o enlaces S-alquilo intramoleculares, *es decir*, -S-(CH<sub>2</sub>)-CONH- o -NH-CO(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-, en donde n es 1, 2, o más.

Un polipéptido dual consiste de dos de los mismos polipéptidos/péptidos, o dos diferentes, unidos covalentemente entre sí, ya sea directamente o mediante un espaciador tal como una extensión corta de residuos de alanina o un sitio potencial para  
25 la proteólisis (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,126,249 y la patente europea núm. 495,049). Los multímeros son moléculas poliméricas formadas a partir de un número del mismo polipéptido o de diferentes polipéptidos. La polimerización se lleva a cabo con un agente de polimerización adecuado, tal como glutaraldehído al 0.1% (ver, por ejemplo, Audibert y otros, 1981, Nature 289:593).

30 En el contexto de la presente invención, un "análogo" es un polipéptido que comprende uno o más aminoácidos de origen no natural. Por ejemplo, un análogo de un polipéptido de la invención puede tener uno o más residuos de aminoácidos reemplazados por el correspondiente residuo de D-aminoácido o con otro aminoácido de origen no natural. Los ejemplos de aminoácidos de origen no natural incluyen, pero sin limitarse a, N- $\alpha$ -metil aminoácidos, C- $\alpha$ -metil aminoácidos,  $\beta$ -metil aminoácidos,  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), norvalina (Nva), norleucina (Nle), ácido 4-aminobutírico ( $\gamma$ -Abu), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), ácido 6-aminohexanoico ( $\epsilon$ -Ahx), ornitina (orn), hidroxiprolina (Hyp), sarcosina, citrulina, ácido cistéico, ciclohexilalanina, ácido  $\alpha$ -amino isobutírico, t-butilglicina, t-butilalanina, ácido 3-aminopropionico, ácido 2,3-  
35 diaminopropionico (2,3-diaP), fenilglicina, 2-naftilalanina (2-Nal), ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic),  $\beta$ -2-tienilalanina (Thi), sulfóxido de metionina (MSO) y homoarginina (Har).

40 Los peptidomiméticos son compuestos que son estructuralmente similares a los polipéptidos y contienen porciones químicas que mimetizan la función de los polipéptidos. Por ejemplo, si un polipéptido contiene dos porciones químicas cargadas con actividad funcional, un mimético coloca dos porciones químicas cargadas en una orientación espacial y estructura restringida de manera que la función química cargada se mantiene en el espacio tridimensional. Por lo tanto el término peptidomimético pretende incluir isómeros. El término "isómero," como se usa en la presente, se refiere a una estructura  
45 química que puede sustituirse por un polipéptido porque la conformación estérica de la estructura química es similar a la del polipéptido, por ejemplo, la estructura se ajusta a un sitio de unión específico para el polipéptido. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen polipéptidos que comprenden una o más modificaciones de la cadena principal (*es decir*, miméticos con enlace amida), que se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de miméticos con enlace amida incluyen, pero sin limitarse a, -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, y -CH<sub>2</sub>SO- (ver, por  
50 ejemplo, Spatola, Vega Data Vol. 1, Aspecto 3, (1983); Spatola, en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983); Morley, J. S., Trends Pharm. Sci. pp. 463-468 (1980); Hudson y otros, Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185 (1979); Spatola y otros, Life Sci. 38:1243-1249 (1986); Hann, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 307-314 (1982); Alinquist y otros, J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980); Jennings-White y otros, Tetrahedron Lett. 23:2533 (1982); Szelke y otros, EP 45665 (1982); Holladay y otros, Tetrahedron Lett. 24:4401-4404 (1983); y Hruby, Life Sci. 31:189-199 (1982)). Otros ejemplos de peptidomiméticos incluyen polipéptidos sustituidos con una o más moléculas de benzodiazepina (ver, por ejemplo, James, G. L. y otros, (1993) Science 260:1937-1942) y polipéptidos que comprenden cadenas principales entrecruzadas para formar lactamas u otras estructuras cíclicas.  
55

Un experto en la técnica apreciará que no todos los aminoácidos en un polipéptido necesitan modificarse. Similarmente no todos los aminoácidos necesitan modificarse de la misma manera. Por lo tanto los derivados, análogos y peptidomiméticos de los polipéptidos de la presente invención incluyen moléculas químicas que contienen dos o más regiones diferentes químicamente, cada región comprende al menos un aminoácido o versión modificada de este.

De acuerdo con la presente invención, un análogo, derivado, variante o fragmento biológicamente activo tiene una actividad sustancialmente idéntica a la del polipéptido de interleucina 17E de origen natural. El término "actividad sustancialmente idéntica" indica una actividad que es aproximadamente 50% de la correspondiente actividad de un polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En una modalidad, una actividad sustancialmente idéntica indica una actividad que es aproximadamente 60% de la correspondiente actividad de un polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En otra modalidad, indica una actividad que es aproximadamente 75% de la correspondiente actividad de un polipéptido de interleucina 17E de origen natural. En el contexto de la presente invención, la actividad biológica de la interleucina 17E se refiere a uno o más de lo siguiente: la capacidad del polipéptido para unirse al receptor de la interleucina 17E (IL17Rh1; conocido además como Receptor IL-17 B (1L-17B R)), la capacidad del polipéptido para estimular la producción de IL-8, la capacidad del polipéptido para promover la expresión de genes Th2 prototipos (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), la capacidad del polipéptido para inducir eosinofilia y la capacidad del polipéptido para inhibir el crecimiento tumoral. Los métodos para evaluar estas actividades biológicas para un polipéptido candidato de IL-17E se conocen bien en la técnica e incluyen los métodos descritos más abajo.

#### Preparación de polipéptidos de Interleucina 17E

Los polipéptidos de interleucina 17E madura están disponibles comercialmente. Por ejemplo, la interleucina 17E humana recombinante en la forma de un homodímero con enlace disulfuro entre aminoácidos (cada dímero comprende los aminoácidos 33-177 de la secuencia que se expone en el Acceso al GenBank núm. Q9H293) puede adquirirse de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN). La interleucina 17E humana recombinante puede adquirirse, además, de PeproTech, Inc. (Rocky Hill, NJ) como un homodímero con enlace disulfuro de 33.8 kDa de dos cadenas de polipéptidos de 145 aminoácidos de la secuencia que se expone en AAG40848 del aminoácido 33 al 177); y de Antigenix America, Inc. (Huntington Station, NY) y Cell Sciences (Canton, MA). La interleucina 17E murina recombinante está disponible también comercialmente de R&D Systems, Inc.

Alternativamente, los polipéptidos de interleucina 17E pueden aislarse o prepararse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la materia, tales como purificación a partir de extractos celulares o el uso de técnicas recombinantes (ver, por ejemplo, Coligan, y otros, eds., Current Protocols in Protein Science, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, y Ausubel y otros, (1994 & actualizado) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York). Los métodos para generar fragmentos de polipéptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen clivaje enzimático, químico o mecánico de la proteína de tipo silvestre o una versión recombinante de esta, expresión de ácidos nucleicos que codifican tales fragmentos, y similares.

Las secuencias más cortas, tales como fragmentos biológicamente activos, pueden además sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos en la técnica que incluyen pero sin limitarse a, síntesis en fase sólida exclusiva, síntesis en fase sólida parcial, condensación de fragmentos o síntesis clásica por solución (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Merrifield (1986) Science 232:341).

Las modificaciones de los polipéptidos para proporcionar análogos y derivados de polipéptidos de origen natural pueden introducirse mediante el uso de técnicas estándar de la química de péptidos. En la técnica se conocen los métodos para sintetizar péptidos que tienen uno o más enlaces peptídicos modificados (ver, por ejemplo, "Solid Phase Peptide Synthesis" Methods in Enzymology (ed. Fields, G.B. (1997) Academic Press, San Diego). Las modificaciones covalentes del polipéptido pueden introducirse, por ejemplo, al hacer reaccionar residuos de aminoácidos dirigidos con un agente orgánico de derivación que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales como se conoce en la técnica. La selección del(de los) agente(s) de derivación adecuados puede lograrse fácilmente por un experto en la técnica.

Los polipéptidos cíclicos que contienen un enlace disulfuro intramolecular pueden prepararse mediante síntesis convencional en fase sólida mientras se incorporan residuos adecuados de homocisteína o cisteína protegida en S en las posiciones seleccionadas para la formación del ciclo (ver, por ejemplo, Sahm y otros, 1996, J. Pharm. Pharmacol. 48:197). Después de completar el ensamble de la cadena, la formación del ciclo puede realizarse ya sea por eliminación selectiva de los grupos que protegen a S con una consiguiente oxidación sobre el soporte de las funciones SH libres correspondientes, para formar enlaces S--S, seguido por la remoción convencional del producto del soporte y el procedimiento de purificación

- 5 adecuado, o por remoción del polipéptido del soporte junto con una desprotección completa de las cadenas laterales, seguido por oxidación de las funciones SH libres en solución acuosa altamente diluida. Similarmente, los derivados cíclicos que contienen un enlace amida intramolecular pueden prepararse mediante síntesis convencional en fase sólida mientras se incorporan derivados de aminoácidos adecuados con protección de las cadenas laterales en los grupos amino y carboxilo en las posiciones seleccionadas para la formación del ciclo, y los polipéptidos cíclicos que contienen enlaces -S-alquilo intramoleculares pueden prepararse mediante síntesis convencional en fase sólida mientras se incorpora un residuo de aminoácido adecuado con una cadena lateral protegida en el grupo amino, y un residuo adecuado de homocisteína o cisteína protegida en S en las posiciones seleccionadas para la formación del ciclo.
- 10 Los polipéptidos de interleucina 17E pueden purificarse cuando sea necesario mediante el uso de técnicas estándar tales como cromatografía (por ejemplo cromatografía de intercambio de iones, de afinidad, y por columna de tamaño o cromatografía líquida de alto rendimiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante otras técnicas familiares al experto en la técnica.
- 15 Polinucleótidos de interleucina 17E y técnicas recombinantes
- Como se indicó anteriormente, para los propósitos de la presente invención, la interleucina 17E puede proporcionarse como un polipéptido, al estimular la producción y/o liberación endógena de interleucina 17E *in vivo* o como un polinucleótido capaz de expresar el polipéptido. En consecuencia, la presente invención proporciona además polinucleótidos de interleucina 17E.
- 20 Los polinucleótidos pueden usarse directamente para expresar el polipéptido *in vivo* o pueden usarse para producir polipéptidos de interleucina 17E mediante técnicas recombinantes. Típicamente las técnicas recombinantes implican transformación (que incluye transfección, transducción, o infección) de una célula huésped adecuada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido.
- 25 Como se indicó anteriormente, las secuencias de los polinucleótidos para varias isoformas de la interleucina 17E se conocen en la técnica y pueden usarse como base para los polinucleótidos para los propósitos de la invención. Los polinucleótidos pueden derivarse o purificarse a partir de una fuente adecuada mediante técnicas estándar. Los polinucleótidos pueden ser ADN genómico o ARN o ADNc preparado a partir de ARNm aislado. Alternativamente, las secuencias conocidas pueden usarse para preparar sondas para obtener otras secuencias de polinucleótidos que codifiquen un polipéptido de interleucina 17E a partir de varias fuentes mediante el uso de técnicas estándar.
- 30 Los polinucleótidos que codifican fragmentos o variantes de un polipéptido de interleucina 17E de origen natural pueden obtenerse mediante delección, adición, y/o sustitución de uno o más nucleótidos dentro de la secuencia codificante mediante el uso de técnicas estándar, tales como técnicas de mutagénesis dirigida a un sitio.
- 35 Los polipéptidos de interleucina 17E pueden producirse además como proteínas de fusión. Un uso de tales proteínas de fusión es mejorar la purificación o detección del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido de interleucina 17E puede fusionarse a un dominio Fc inmunoglobulínico y la proteína de fusión resultante puede purificarse fácilmente mediante el uso de una columna de proteína A. Otros ejemplos de proteínas de fusión incluyen polipéptidos fusionados a etiquetas de histidina (lo que permite la purificación en columnas de resina de Ni<sup>2+</sup>), a la glutatión-S-transferasa (lo que permite la purificación en columnas de glutatión) o a biotina (lo que permite la purificación en columnas de estreptavidina o con perlas magnéticas marcadas con estreptavidina). Una vez que la proteína de fusión se ha purificado, la etiqueta puede eliminarse mediante clivaje específico del sitio mediante el uso de métodos químicos o enzimáticos conocidos en la técnica.
- 40 Alternativamente, si la etiqueta no interfiere con la actividad del polipéptido de interleucina 17E, la proteína de fusión puede dejarse intacta.
- 45 Pueden requerirse señales de iniciación específicas para una traducción eficiente de un polinucleótido clonado. Estas señales incluyen, por ejemplo un codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos donde un gen completo de tipo silvestre o un ADNc, que incluyen su propio codón de iniciación y secuencias adyacentes, se insertan en el vector de expresión adecuado, pueden no necesitarse señales de control traduccional adicionales. En otros casos, tienen que proporcionarse señales de control traduccional exógenas, que incluyen, por ejemplo, el codón de iniciación ATG. Un experto en la técnica comprenderá que el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control traduccional exógenas y los codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción adecuados y/o terminadores de transcripción (Bittner y otros, (1987) *Methods in Enzymol.* 153,516).
- 50  
55

Los vectores de expresión adecuados para su uso con las secuencias de los polinucleótidos contemplados por la presente

invención incluyen, pero sin limitarse a, plásmidos, fagémidos, partículas y vectores virales, fagos y similares. Para células de insectos, los vectores de expresión de baculovirus son adecuados. Para las células vegetales son adecuados los vectores de expresión virales (tales como el virus del mosaico de la coliflor y el virus del mosaico del tabaco) y vectores de expresión plasmídicos (tal como el plásmido Ti). El vector de expresión completo, o una parte de este, puede integrarse en el genoma de la célula huésped. En algunas circunstancias, se prefiere emplear un vector de expresión inducible como se conoce en la técnica.

Los expertos en el campo de la biología molecular comprenderán que puede usarse una amplia variedad de sistemas de expresión para proporcionar el polipéptido recombinante. La célula huésped precisa usada no es fundamental para la invención. El polipéptido puede producirse en un huésped procariota (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*) o en un huésped eucariota (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Pichia*; células de mamíferos, tales como células COS, NIH 3T3, CHO, BHK, 293, o HeLa; células de insectos; o células vegetales). Los métodos de transformación o transfección y la opción del vector de expresión dependerán del sistema hospedero seleccionado y pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica. Los métodos de transformación y transfección se describen, por ejemplo, en Ausubel y otros, (1994) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York; y varios vectores de expresión pueden seleccionarse a partir de los proporcionados, por ejemplo, en Cloning Vectors: A Laboratory Manual (Pouwels y otros, 1985, Supp. 1987) y por varios suministradores comerciales.

Además, se puede elegir una célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico de una manera específica deseada. Estas modificaciones (*por ejemplo*, glucosilación) y procesamiento (*por ejemplo*, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la actividad de la proteína. Las diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Las líneas celulares o los sistemas hospederos adecuados pueden elegirse por un experto en la técnica para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína heteróloga expresada.

Las células huésped que albergan el vehículo de expresión pueden cultivarse en medios nutricionales convencionales adaptados como se necesite para la activación de un gen elegido, represión de un gen elegido, selección de transformantes, o amplificación de un gen elegido de acuerdo con procedimientos conocidos.

#### Actividad biológica de los polipéptidos de interleucina 17E

Como se indicó anteriormente, los polipéptidos de interleucina 17E candidatos que son análogos, derivados, variantes o fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de IL-17E de origen natural tienen una actividad sustancialmente idéntica a la del polipéptido de interleucina 17E de origen natural, en donde la actividad es uno o más de lo siguiente: la capacidad del polipéptido para unirse al receptor de interleucina 17E (IL17Rh1; conocido además como Receptor IL-17 B (1L-17B R)), la capacidad del polipéptido para estimular la producción de IL-8, la capacidad del polipéptido para promover la expresión de genes Th2 prototipos (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), la capacidad del polipéptido para inducir eosinofilia y la capacidad del polipéptido para inhibir el crecimiento tumoral.

Las actividades biológicas anteriores para un polipéptido candidato de interleucina 17E se pueden medir utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Coligan, y otros, eds., Current Protocols in Protein Science, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, y Coligan, y otros, eds., Current Protocols in Immunology, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY).

Por ejemplo, la capacidad del polipéptido para unirse al receptor de interleucina 17E puede medirse por técnicas de Membrana de Western (ver Lee, y otros, J. Biol. Chem., 276:1660-1664 (2001)). La capacidad del polipéptido para estimular la producción de IL-8 puede evaluarse *in vitro* al poner en contacto una línea celular adecuada (por ejemplo, líneas celulares derivadas de riñón humano TK-10) con el polipéptido candidato, o un polinucleótido que codifica al polipéptido, y evaluar la cantidad de IL-8 producida en comparación con un control adecuado (ver, por ejemplo, Lee, y otros, J. Biol. Chem., 276:1660-1664 (2001)). La capacidad del polipéptido de interleucina 17E candidato para estimular la producción de IL-8 puede evaluarse además *in vivo* al administrar el polipéptido candidato, o un polinucleótido que codifica al polipéptido, a un animal de prueba adecuado y evaluar la cantidad de IL-8 producida en tejidos seleccionados en comparación con un control adecuado. La producción de IL-8 puede determinarse, por ejemplo, mediante un ELISA estándar. Los kits de ELISA para IL-8 están comercialmente disponibles por ejemplo de R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). Técnicas similares pueden emplearse para determinar la capacidad del polipéptido para promover la expresión de genes Th2 prototipos (tales como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) (ver, por ejemplo, Kim, y otros, Blood, 100:2330-2340 (2002); Pan y otros, J. Immunol., 167:6559-67 (2001)).

La capacidad del polipéptido para inducir eosinofilia puede evaluarse *in vivo* usando técnicas conocidas en la materia (ver, por ejemplo, Kim, y otros, Blood, 100:2330-2340 (2002) y los ejemplos proporcionados en la presente descripción). La capacidad del polipéptido para inhibir el crecimiento tumoral también puede evaluarse *in vivo* mediante el uso de técnicas estándar para determinar la actividad contra el cáncer de un compuesto (ver, por ejemplo, Enna, y otros, Current Protocols in Pharmacology, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY). Los métodos ilustrativos se describen en más detalle más abajo y en los Ejemplos proporcionados en la presente.

#### Inductores de interleucina 17E

Como se indicó anteriormente, para los propósitos de la presente invención, la interleucina 17E puede proporcionarse, además, al estimular la producción y/o la liberación endógena de la interleucina 17E *in vivo*. En consecuencia, la presente invención proporciona, además, inductores de la interleucina 17E para estimular la producción y/o liberación endógena de interleucina 17E *in vivo*. Alternativamente, los inductores pueden usarse para estimular la producción y/o liberación de interleucina 17E *in vitro* para el posterior aislamiento y uso. Un experto en la técnica sería capaz de aislar fácilmente la interleucina 17E mediante el uso de técnicas conocidas en la materia.

Un ejemplo de un inductor de interleucina 17E es una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM), como se representa en solicitudes internacionales de patente núms. WO 95/07089, WO 96/28175 y WO 02/38164 y patentes de los Estados Unidos núms. 6,280,774 y 6,596,319. La composición BD-BRM comprende componentes de pequeño peso molecular de menos de 3000 daltons, y tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- a) se extrae a partir de la bilis de animales;
- b) es capaz de estimular o activar monocitos y/o macrófagos *in vitro* y/o *in vivo*;
- c) es capaz de modular la producción y/o la liberación del factor de necrosis tumoral;
- d) contiene niveles no medibles de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-4, GM-CSF o IFN- $\gamma$ ;
- e) no muestra citotoxicidad para células humano mononucleares de sangre periférica o linfocitos; y
- f) no es una endotoxina.

Otros inductores pueden identificarse fácilmente por un experto en la técnica. La capacidad del compuesto o composición candidatos para estimular la producción y/o liberación de IL-17E puede probarse al tratar ya sea una línea celular o células aisladas adecuadas de un animal de prueba con el compuesto o la composición candidatos y analizar la cantidad de IL-17E producida, ya sea directamente al analizar la cantidad de proteína producida, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de membrana de Western, ELISA o citometría de flujo, o indirectamente al detectar la cantidad de ARNm de IL-17E producida, por ejemplo, mediante análisis de hibridación, análisis de membrana de Northern o RT-PCR. La cantidad de IL-17E producida en células tratadas con el compuesto o composición candidatos puede compararse después con un control adecuado, tal como células no tratadas, o células tratadas con un compuesto control estándar conocido por estimular la producción de IL-17E. Alternativamente, la capacidad del compuesto o la composición candidatos para estimular la producción y/o liberación endógena de IL-17E puede probarse *in vivo* mediante el uso de métodos similares en animales de prueba normales o en un adecuado modelo animal de la enfermedad. Por ejemplo, el suero de ratones tratados con el compuesto o la composición candidatos puede analizarse para la interleucina 17E y compararse con un control adecuado, tal como suero de animales no tratados, o suero de animales tratados con un compuesto control estándar conocido por estimular la producción de IL-17E.

Se ha identificado un número de compuestos que estimulan la producción de interleucina 17E (interleucina 25). Por ejemplo, se ha demostrado que el ionóforo de calcio A23187 en combinación con miristato acetato de forbol (PMA) inducen la producción de IL-25 en mastocitos derivados de médula ósea de ratón *in vitro* (Ikeda K., y otros, (2003) Blood 101:3594-3596). Se ha demostrado además que el entrecruzamiento de inmunoglobulina E (IgE) con mastocitos derivados de médula ósea de ratón induce la producción de IL-25 *in vitro* (Ikeda K., y otros, (2003) Blood 101:3594-3596). Las partículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) dadas a ratas mediante administración intratraqueal se ha demostrado que inducen la producción de IL-25 en macrófagos alveolares (Kang CM. y otros, (2005) Am J Respir Cell Mol Biol. 33:290-6). Adicionalmente, los ratones infectados ya sea con el hongo *Aspergillus fumigatus* o el parásito nemátodo *Nippostrongylus brasiliensis* muestran un

aumento de la expresión de ARNm de IL-25 en pulmones e intestino, respectivamente (Hurst, S.D., y otros, (2002) J Immunol. 169:443-53.

Terapias contra el cáncer

Como se indicó anteriormente, la presente invención contempla el uso de la interleucina 17E ya sea sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento del cáncer. Las terapias contra el cáncer para su uso en la presente invención incluyen compuestos, composiciones o tratamientos que evitan o demoran el crecimiento y/o metástasis de células cancerosas. Tales terapias contra el cáncer incluyen, pero sin limitarse a, tratamiento con fármacos quimioterapéuticos, radiación, terapia génica, manipulación hormonal, inmunoterapia y terapia antisentido con oligonucleótidos. Debe entenderse que las terapias contra el cáncer para su uso en la presente invención incluyen, además, compuestos o tratamientos nuevos desarrollados en el futuro.

Quimioterapéuticos

En la técnica se conoce una amplia variedad de quimioterapéuticos y pueden usarse en terapias de combinación con interleucina 17E. Los agentes quimioterapéuticos conocidos incluyen los que son específicos para el tratamiento de un tipo particular de cáncer así como los que son aplicables a una variedad de tipos de cáncer, tales como doxorubicina, capecitabina, mitoxantrona, irinotecan (CPT-11), cisplatino y gemcitabina. El etopósido generalmente es aplicable en el tratamiento de leucemias (que incluyen leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda), tumores de células germinales, enfermedad de Hodgkin y varios sarcomas. La citarabina (Ara-C) es aplicable, además, en el tratamiento de varias leucemias, que incluyen leucemia mieloide aguda, leucemia meníngea, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, eritroleucemia; así como linfoma no Hodgkin.

La presente invención contempla el uso de ambos tipos de agentes quimioterapéuticos junto con la interleucina 17E. Los quimioterapéuticos ilustrativos que pueden usarse solos o en varias combinaciones para el tratamiento específico de tipos de cáncer se proporcionan en la Tabla 1. Un experto en la técnica apreciará que muchos otros quimioterapéuticos están disponibles y que la siguiente lista solo pretende proporcionar ejemplos no limitantes.

Tabla 1: Agentes quimioterapéuticos ilustrativos usados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer comunes

Cáncer	QUIMIOTERAPÉUTICA	
Leucemia linfocítica aguda (ALL)	Pegaspargasa (por ejemplo, Oncaspar®) Cytarabine	L-asparaginasa
Leucemia mieloide aguda (AML)	Citarabina	Idarubicina
Cáncer del cerebro	Procarbazina (por ejemplo, Matulane®)	Nitrosoureas
	Análogos de platino	Temozolomida
Cáncer de mama	Capecitabina (por ejemplo, Xeloda®)	ciclofosfamida
	5-fluorouracilo (5-FU)	Carboplatino
	Paclitaxel (por ejemplo, Taxol®)	Cisplatino



ES 2 533 970 T3

	Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)	Ifosfamida
	Epi-doxorubicina (epirubicina)	Doxorubicina ( <i>por ejemplo</i> , Adriamycin®)
	Tamoxifeno	
5	Leucemia mieloide crónica (CML)	Citarabina
	Cáncer de colon	Edatrexato (10-etil-10-deaza-aminopterin)
		Metil-cloroetil-ciclohexilo-nitrosourea
10		5-fluorouracilo (5-FU)
		Levamisol
		Fluorodeoxiuridina (FUdR)
		Vincristina
		Capecitabina ( <i>por ejemplo</i> , Xeloda®)
		Oxaliplatino
15	Cáncer colorrectal	Irinotecan (CPT-11, <i>por ejemplo</i> Camptosar®)
		Loperamida ( <i>por ejemplo</i> , Imodium®)
		5-fluorouracilo (5-FU)
20		Topotecan ( <i>por ejemplo</i> , Hycamtin®)
		Metotrexato
		Capecitabina ( <i>por ejemplo</i> Xeloda®)
		Oxaliplatino
25	Vesícula biliar	5-fluorouracilo (5-FU)
	Cáncer genitourinario	Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)
	Cáncer d cabeza y cuello	Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)
		Cisplatino
30	Linfoma de No-Hodgkin	Procarbazina ( <i>por ejemplo</i> Matulane®)
		Citarabina
		Etoposido
35	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL)	Tartrato de vinorelbina ( <i>por ejemplo</i> , Navelbine®)
		Irinotecan (CPT-11, <i>por ejemplo</i> , Camptosar®)
40		Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> . Taxotere®)
		Paclitaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxol®)
		Gemcitabina ( <i>por ejemplo</i> , Gemzar®)
		Topotecan
	Cáncer del esófago	porfímero sodio ( <i>por ejemplo</i> , Photofrin®)
		Cisplatino
45	Cáncer de ovario	Irinotecan (CPT-11, <i>por ejemplo</i> , Camptosar®)
		Topotecan ( <i>por ejemplo</i> , Hycamtin®)
50		Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)
		Paclitaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxol®)
		Gemcitabina ( <i>por ejemplo</i> , Gemzar®)
		Amifostina ( <i>por ejemplo</i> , Ethyl®)
55	Cáncer pancreático	Irinotecan (CPT-11, <i>por ejemplo</i> Camptosar®)
		Gemcitabina ( <i>por ejemplo</i> , Gemzar®)
		5-fluorouracilo (5-FU)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Leucemia promielocítica	Tretinoin ( <i>por ejemplo</i> Vesanoid®)	
Cáncer de próstata	Acetato de goserelina ( <i>por ejemplo</i> Zoladex®)	
	Mitoxantrona ( <i>por ejemplo</i> Novantrone®)	
	Prednisona ( <i>por ejemplo</i> Deltasone®)	Liarozol
	Nilutamida ( <i>por ejemplo</i> Nilandron®)	Flutamida ( <i>por ejemplo</i> Eulexin®)
	Finasteride ( <i>por ejemplo</i> Proscar®)	Terazosina ( <i>por ejemplo</i> , Hytrin®)
	Doxazosina ( <i>por ejemplo</i> , Cardura®)	ciclofosfamida
	Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)	Estramustina
	Agonista de la hormona de liberación de la hormona luteinizante	
Cáncer renal	Capecitabina ( <i>por ejemplo</i> , Xeloda®)	Gemcitabina ( <i>por ejemplo</i> , Gemzar®)
Cáncer de pulmón de células pequeñas	ciclofosfamida	Vincristina
	Doxorubicina	Etoposido
Tumores sólidos	Gemcitabina ( <i>por ejemplo</i> , Gemzar®)	ciclofosfamida
	Capecitabina ( <i>por ejemplo</i> , Xeloda®)	Ifosfamida
	Paclitaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxol®)	Cisplatino
	Docetaxel ( <i>por ejemplo</i> , Taxotere®)	Carboplatino
	Epi-doxorubicina (epirubicina)	Doxorubicina ( <i>por ejemplo</i> Adriamycin®)
	5-fluorouracilo (5-FU)	

50

Como se indicó anteriormente, pueden emplearse combinaciones de agentes quimioterapéuticos. Las terapias de combinación que usan agentes quimioterapéuticos estándar para el cáncer son bien conocidas en la técnica y tales combinaciones pueden usarse, además, junto con la interleucina 17E.

55

Las terapias de combinación ilustrativas incluyen para el tratamiento de los cánceres de mama la combinación de epirubicina con paclitaxel o docetaxel, o la combinación de doxorubicina o epirubicina con ciclofosfamida. Además los regímenes poliquimioterapéuticos son útiles y pueden consistir, por ejemplo, de doxorubicina/ciclofosfamida/5-fluorouracilo

o ciclofosfamida/epirrubicina/5-fluorouracilo. Muchas de las combinaciones anteriores son útiles en el tratamiento de una variedad de otros tumores sólidos.

5 Las combinaciones de etopósido con cisplatino o carboplatino se usan en el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas. En el tratamiento de cáncer de estómago o esófago, las combinaciones de doxorubicina o epirrubicina con cisplatino y 5-fluorouracilo son útiles. Para el cáncer colorrectal, puede usarse CPT-11 en combinación con fármacos basados en 5-fluorouracilo, u oxaliplatino en combinación con fármacos basados en 5-fluorouracilo. El oxaliplatino puede usarse, además, en combinación con capecitabina.

10 Otros ejemplos incluyen la combinación de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona en el tratamiento de linfoma no Hodgkin; la combinación de doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina (DTIC) en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin y la combinación de cisplatino o carboplatino con cualquiera, o una combinación, de gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina o etopósido en el tratamiento de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

15 Varios sarcomas se tratan mediante terapia de combinación, por ejemplo, para el osteosarcoma se usan combinaciones de doxorubicina y cisplatino o metotrexato con leucovorina; para sarcomas avanzados puede usarse el etopósido en combinación con ifosfamida; para el sarcoma de tejidos blandos pueden usarse la doxorubicina o dacarbazina solas o, para sarcomas avanzados puede usarse la doxorubicina en combinación con ifosfamida o dacarbazina, o el etopósido en combinación con ifosfamida.

20 El sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico periférico (PNET) o el rhabdomyosarcoma pueden tratarse mediante el uso de etopósido e ifosfamida, o una combinación de vincristina, doxorubicina y ciclofosfamida.

25 Los agentes alquilantes ciclofosfamida, cisplatino y melfalán también se usan frecuentemente en terapias de combinación con otros quimioterapéuticos en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

30 En una modalidad de la presente invención, la interleucina 17E se usa en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer. En otra modalidad de la presente invención, al menos uno de los quimioterapéuticos es un agente quimioterapéutico de amplio espectro. En una modalidad adicional, al menos uno de los quimioterapéuticos es dacarbazina (DTIC), cisplatino, Taxotere®, Tarceva®, o CPT-11.

#### *Inmunoterapéuticos*

35 En la técnica se conoce una amplia variedad de inmunoterapéuticos y pueden usarse en terapias de combinación con la interleucina 17E. La inmunoterapia es una terapia que estimula directa o indirectamente o mejora la respuesta del sistema inmune contra las células cancerosas y/o atenúa los efectos secundarios que pueden causar otros agentes contra el cáncer. La inmunoterapia se refiere, además, en la técnica como terapia inmunológica, terapia biológica, terapia y bioterapia modificadora de la respuesta biológica. Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos comunes conocidos en la técnica y contemplados para la inclusión en los productos de combinación de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, citocinas, adyuvantes que no son citocinas, anticuerpos (que incluyen, pero sin limitarse a anticuerpos monoclonales), vacunas (que incluyen, pero sin limitarse a vacunas para el cáncer) y composiciones inmunomoduladoras.

40 Los agentes inmunoterapéuticos pueden ser no específicos, *es decir* estimulan el sistema inmune generalmente de manera que se vuelve más eficaz en la lucha contra el crecimiento y/o dispersión de células cancerosas, o pueden ser específicos, *es decir* dirigidos a las células cancerosas propias. Los regímenes de inmunoterapia pueden combinar el uso de agentes inmunoterapéuticos no específicos y específicos.

45 Los agentes inmunoterapéuticos no específicos son sustancias que estimulan o aumentan indirectamente el sistema inmune. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos se han usado solos como la terapia principal para el tratamiento del cáncer, así como adicionalmente a una terapia principal, en cuyo caso el agente inmunoterapéutico no específico funciona como un adyuvante para mejorar la eficacia de otras terapias (*por ejemplo* vacunas para cáncer). Los agentes inmunoterapéuticos no específicos además pueden funcionar en este último contexto para reducir los efectos secundarios de otras terapias, por ejemplo, supresión de la médula ósea inducida por ciertos agentes quimioterapéuticos. Los agentes inmunoterapéuticos no específicos pueden actuar sobre células claves del sistema inmune y provocar respuestas secundarias, tales como aumento de la producción de citocinas e inmunoglobulinas. Alternativamente, los agentes pueden ellos mismos comprender citocinas.

Un número de citocinas han encontrado aplicación en el tratamiento del cáncer ya sea como inmunoterapias no específicas

generales diseñadas para estimular el sistema inmune, o como adyuvantes proporcionados con otras terapias. Las citocinas adecuadas para su uso en las terapias de combinación de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, interferones, interleucinas y factores de estimulación de colonias.

5 Los interferones (IFN) contemplados por la presente invención para su uso en combinación con la interleucina 17E incluyen los tipos comunes de IFN, IFN-alfa (IFN- $\alpha$ ), IFN-beta (IFN- $\beta$ ) e IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ). Los IFN pueden actuar directamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, al enlentecer su crecimiento, promover su desarrollo a células con un comportamiento más normal y/o aumentar su producción de antígenos lo que hace así que las células cancerosas sean más fáciles de identificar y destruir por el sistema inmune. Los IFN pueden, además, actuar indirectamente sobre las células cancerosas, por ejemplo, al enlentecer la angiogénesis, lo que impulsa al sistema inmune y/o estimula a células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos.

10 Las interleucinas contempladas por la presente invención para su uso en combinación con la interleucina 17E incluyen IL-2, IL-4, IL-11 e IL-12 (u oprelvekin). Los ejemplos de interleucinas recombinantes disponibles comercialmente incluyen Proleukin® (IL-2; Chiron Corporation) y Neumega® (IL-12; Wyeth Pharmaceuticals). Actualmente Zymogenetics, Inc. (Seattle, WA) realiza pruebas de una forma recombinante de IL-21, la cual, además, se contempla para su uso en las combinaciones de la presente invención. Las interleucinas, solas o en combinación con otros inmunoterapéuticos o con quimioterapéuticos, han mostrado eficacia en el tratamiento de varios tipos de cáncer que incluyen cáncer renal (que incluye cáncer renal metastásico), melanoma (que incluye melanoma metastásico), cáncer de ovario (que incluye cáncer de ovario recurrente), cáncer cervical (que incluye cáncer cervical metastásico), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, leucemias y linfomas.

15 Un conjugado interleucina-inmunotoxina conocido como denileukin diftitox (u Ontak; Seragen, Inc), el cual comprende un conjugado de IL-2 con la toxina de la difteria, se ha aprobado por la FDA para el tratamiento de linfoma cutáneo de células T y puede incluirse además en las terapias de combinación de la presente invención.

20 Los factores estimulantes de colonias (CSF) contemplados por la presente invención para su uso en las terapias de combinación incluyen el factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF o filgrastim), el factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o sargramostim) y la eritropoyetina (epoetina alfa, darbepoietina). El tratamiento con uno o más factores de crecimiento puede ayudar a estimular la generación de nuevas células sanguíneas en pacientes que sufren la quimioterapia tradicional. En consecuencia, el tratamiento con CSF puede ser útil para disminuir los efectos secundarios asociados con la quimioterapia y pueden permitir el uso de mayores dosis de agentes quimioterapéuticos.

25 Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos no específicos que no son citocinas adecuados para su uso en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, Levamisol, hidróxido de alumbre (alumbre), bacilo de Calmette-Guerin (BCG), adyuvante incompleto de Freund (IFA), QS-21, DETOX, hemocianina de lapa californiana (KLH), dinitrofenilo (DNP) y el modificador de la respuesta biológica derivado de la bilis derivado de bilis bovina (BD-BRM) (descrito en las solicitudes de patentes internacionales WO 95/07089, WO 96/28175 y WO 02/38164 y en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,280,774 y 6,596,319). Los adyuvantes que no son citocinas en combinación con otros inmuno- y/o quimioterapéuticos han demostrado eficacia contra varios tipos de cáncer que incluyen, por ejemplo, cáncer de colon y cáncer colorrectal (Levamisol); melanoma (BCG y QS-21); cáncer renal y cáncer de vejiga (BCG).

30 En una modalidad de la presente invención, la interleucina 17E se usa en terapias de combinación con BD-BRM. La composición BD-BRM comprende componentes de pequeño peso molecular de menos de 3000 daltons, y tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- a) se extrae a partir de la bilis de animales;
- 35 b) es capaz de estimular o activar monocitos y/o macrófagos *in vitro* y/o *in vivo*;
- c) es capaz de modular la producción y/o la liberación del factor de necrosis tumoral;
- 40 d) contiene niveles no medibles de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-4, GM-CSF o IFN- $\gamma$ ;
- 45 e) no muestra citotoxicidad para células mononucleares o linfocitos de sangre periférica humana; y
- f) no es una endotoxina.

La composición BD-BRM puede prepararse como se describe en las solicitudes de patentes internacionales núms. WO 95/07089, WO 96/28175 y WO 02/38164 y en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,280,774 y 6,596,319. La composición BD-BRM puede caracterizarse mediante la evaluación de sus propiedades inmunomoduladoras conocidas, es decir la capacidad para estimular monocitos y macrófagos *in vitro* e *in vivo*, y la capacidad para modular la producción y/o liberación del factor de necrosis tumoral como se describió anteriormente (ver las patentes de los Estados Unidos núms. 6,280,774 y 6,596,319). Estudios más recientes han indicado que la composición BD-BRM puede mediar su actividad antitumoral a través de la estimulación de una expansión e infiltración sostenidas de células asesinas naturales (NK) y macrófagos en los tumores con posterior activación de las células NK (Cao M. Y., y otros, (2005) Cancer Immunol Immunother. 54:229-42. (Epub 2004 Sep 17)).

Varios estudios clínicos Fase I y Fase II han demostrado que la composición BD-BRM tiene actividad antitumoral contra el cáncer pancreático y el melanoma, y tiene un efecto clínico sobre la estabilización de la enfermedad y la supervivencia en pacientes con cáncer pancreático y melanoma maligno (Ferdinandi y otros, (1999) Exp Opin Invest Drugs 8: 1721-1735; y Liu y otros, (2000) Drugs of the Future 25: 356-359).

Además de tener objetivos específicos o no específicos, los agentes inmunoterapéuticos pueden ser activos, es decir estimular la propia respuesta inmune corporal, o pueden ser pasivos, es decir comprender componentes del sistema inmune que se generaron de manera externa al cuerpo. Ambos tipos de agentes inmunoterapéuticos son adecuados para su uso con la interleucina 17E en las terapias de combinación de la presente invención.

La inmunoterapia específica pasiva típicamente implica el uso de uno o más anticuerpos monoclonales que son específicos para un antígeno particular encontrado en la superficie de una célula cancerosa o que son específicos para un factor de crecimiento celular particular. Los anticuerpos monoclonales pueden usarse en el tratamiento del cáncer en un número de formas, por ejemplo, para mejorar la respuesta inmune del sujeto a un tipo de cáncer específico, para interferir con el crecimiento de células cancerosas al dirigir factores de crecimiento celular específicos, tales como los implicados en la angiogénesis, o al mejorar la entrega de otros agentes contra el cáncer a células cancerosas cuando están unidos o conjugados a agentes tales como agentes quimioterapéuticos, partículas radioactivas o toxinas.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la actualidad como agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer que son adecuados para su inclusión en las combinaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, rituximab (Rituxan®), trastuzumab (Herceptin®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), tositumomab (Bexxar®), cetuximab (C-225, Erbitux®), bevacizumab (Avastin®), gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®), alemtuzumab (Campath®), y BL22.

Los anticuerpos monoclonales se usan en el tratamiento de una amplia variedad de cánceres que incluyen linfomas (tal como linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica de células B, (B-CLL)), mielomas (como mieloma múltiple), leucemias (como leucemia de células B o leucemia mielógena aguda), cáncer de mamas (que incluyen cáncer de mama metastásico avanzado), cáncer colorrectal (que incluyen cáncer colorrectal avanzado y/o metastásico), cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer cervical, melanoma y tumores cerebrales. Los anticuerpos monoclonales pueden usarse solos o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos o agentes quimioterapéuticos.

La inmunoterapia específica activa típicamente implica el uso de vacunas contra el cáncer. Se han desarrollado vacunas contra el cáncer que comprenden las células cancerosas enteras, partes de células de cáncer o uno o más antígenos derivados de las células cancerosas. Las vacunas contra el cáncer, solas o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunológicas están siendo investigadas en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el melanoma, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y leucemia. Los inmunoterapéuticos no específicos son útiles en combinación con vacunas para el cáncer con el objetivo de mejorar la respuesta inmune corporal.

En una modalidad de la presente invención, la interleucina 17E se usa en combinación con una o más inmunoterapias para el tratamiento del cáncer. En otra modalidad, la interleucina 17E se usa en combinación con una o más inmunoterapias específicas. En otra modalidad, la interleucina 17E se usa en combinación con un anticuerpo monoclonal. En otra modalidad, la interleucina 17E se usa en combinación con una o más inmunoterapias no citocinas no específicas para el tratamiento del cáncer.

Eficacia de la interleucina 17E

La eficacia contra el cáncer de la interleucina 17E puede probarse *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de técnicas estándar conocidas en la materia. En el contexto de la presente invención, la interleucina 17E se considera que demuestra una eficacia contra el cáncer cuando inhibe la proliferación de células neoplásicas y/o inhibe el crecimiento tumoral. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que pueden requerirse tanto pruebas *in vitro* como *in vivo* con el objetivo de confirmar la actividad contra el cáncer de un polipéptido de interleucina 17E y que un fallo en demostrar un efecto antiproliferativo en un ensayo *in vitro* particular puede no ser indicativo de una falta de actividad antiproliferativa en otros ensayos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, algunos polipéptidos de interleucina 17E fallan en demostrar actividad antiproliferativa *in vitro* cuando se usa el ensayo de XTT, pero demuestran actividad contra el cáncer *in vivo*. En consecuencia, la capacidad de un candidato de interleucina 17E para ejercer un efecto contra el cáncer puede necesitar probarse en más de un tipo de ensayo.

#### Pruebas *in vitro*

Las determinaciones iniciales de la eficacia de la interleucina 17E pueden realizarse mediante el uso de uno o más ensayos *in vitro* estándar. Por ejemplo, la capacidad de la interleucina 17E para inhibir la proliferación de células neoplásicas puede ensayarse *in vitro* mediante el uso de una línea celular de cáncer adecuada. En general, las células de la línea celular de prueba seleccionada se cultivan hasta una densidad adecuada y se añade el compuesto candidato. Después de un tiempo de incubación adecuado (por ejemplo, aproximadamente 48 a 72 horas), se evalúa la supervivencia celular. Los métodos para determinar la supervivencia celular se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, la prueba de reducción de resazurin (ver Fields & Lancaster (1993) *Am. Biotechnol. Lab.* 11:48-50; O'Brien y otros, (2000) *Eur. J. Biochem.* 267:5421-5426 y patente de los Estados Unidos núm. 5,501,959), el ensayo de sulforodamina (Rubinstein y otros, (1990) *J. Natl. Cancer Inst.* 82:113-118), la prueba de tinte rojo neutro (Kitano y otros, (1991) *Euro. J. Clin. Investg.* 21:53-58; West y otros, (1992) *J. Investigative Derm.* 99:95-100) o el ensayo XTT. La comparación de la supervivencia celular en el cultivo tratado con la supervivencia celular en uno o más cultivos controles, por ejemplo, cultivos no tratados y/o cultivos pre-tratados con un compuesto control (típicamente un agente terapéutico conocido), proporciona una indicación de la capacidad del candidato a interleucina 17E para inhibir la proliferación de las células.

Alternativamente, la interleucina 17E puede probarse *in vitro* al determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de células tumorales independientes del anclaje. El crecimiento independiente del anclaje se conoce en la técnica por ser un buen indicador de carcinogenicidad. En general, el crecimiento independiente del anclaje se evalúa al sembrar las células de una línea celular de cáncer seleccionada en agar blando y determinar el número de colonias formadas después de un período de incubación adecuado. El crecimiento de las células tratadas con interleucina 17E puede compararse después con el de las células control (como se describió anteriormente).

Una variedad de líneas celulares de cáncer adecuadas para probar la interleucina 17E de acuerdo con la invención se conocen en la técnica y muchas están disponible comercialmente (por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, Manassas, VA). En una modalidad de la presente invención, se realizan pruebas *in vitro* de la interleucina 17E en una línea celular de cáncer humano. Los ejemplos de líneas celulares de cáncer adecuadas para las pruebas *in vitro* incluyen, pero sin limitarse a, líneas celulares mesoteliales MSTO-211H, NCI-H2052 y NCI-H28, líneas celulares de cáncer de ovario OV90 y SK-OV-3, líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, líneas celulares de cáncer de colon CaCo, HCT116 y HT29, línea celular de cáncer cervical HeLa, líneas celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas A549 y H1299, líneas celulares de cáncer pancreático MIA-PaCa-2 y AsPC-1, línea celular de cáncer prostático PC-3, línea celular de cáncer de vejiga T24, línea celular de cáncer hepático HepG2, línea celular de cáncer de cerebro U-87 MG, línea celular de melanoma A2058, línea celular de cáncer de pulmón NCI-H460. Otros ejemplos de líneas celulares adecuadas se conocen en la técnica.

Si es necesario, la toxicidad de la interleucina 17E puede evaluarse además inicialmente *in vitro* mediante el uso de técnicas estándar. Por ejemplo, pueden transfectarse fibroblastos primarios humanos *in vitro* con interleucina 17E y después probarse su viabilidad en diferentes puntos de tiempo después del tratamiento mediante el uso de un ensayo de viabilidad estándar, tal como los ensayos descritos anteriormente, o el ensayo de exclusión de azul tripán. Las células pueden, además, ensayarse según su capacidad de sintetizar ADN, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de incorporación de timidina, y según los cambios en la dinámica del ciclo celular, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de clasificación celular estándar junto con un clasificador celular fluorocitométrico (FACS).

#### Pruebas *in vivo*

La capacidad de la interleucina 17E para inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células neoplásicas *in vivo* puede determinarse en un modelo animal adecuado mediante el uso de técnicas estándar conocidas en la materia (ver, por ejemplo, Enna, y otros, *Current Protocols in Pharmacology*, J. Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY). El crecimiento tumoral

puede inhibirse al eliminar directa o indirectamente las células neoplásicas, inhibir el crecimiento de las células neoplásicas, inhibir la proliferación de las células neoplásicas o una combinación de estos. El efecto de la interleucina 17E sobre el crecimiento tumoral puede ser citotóxico o citostático, y puede resultar en una reducción global del tamaño del tumor o en un enlentecimiento o prevención de un aumento del tamaño del tumor.

5

Los modelos animales para el tamizaje de compuestos antitumorales incluyen modelos de xenoinjertos, en los cuales se ha implantado un tumor humano en un animal. Los ejemplos de modelos de xenoinjertos de cáncer humano incluyen, pero sin limitarse a, xenoinjertos de tumor humano sólido, implantados mediante inyección o implantación subcutánea y usados en ensayos de crecimiento tumoral; isoinjertos de tumor humano sólido, implantados mediante inyección en la almohadilla adiposa y usados en ensayos de crecimiento tumoral; xenoinjertos ortotópicos de tumor humano sólido, implantados directamente en el tejido relevante y usados en ensayos de crecimiento tumoral; modelos experimentales de linfoma y leucemia en ratones, usados en ensayos de supervivencia, y modelos experimentales de metástasis pulmonar en ratones. Además de las células tumorales humanas implantadas, los modelos de xenoinjertos pueden comprender, además, leucocitos de sangre periférica humana trasplantados, lo que permite la evaluación de la respuesta inmune contra el cáncer.

10

15

Alternativamente, los modelos de cáncer murino pueden usarse para el tamizaje de compuestos antitumorales. Los ejemplos de modelos de cáncer murino adecuados se conocen en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, modelos de implantación en los cuales se implantan células cancerosas murinas mediante inyección intravenosa, subcutánea, en la almohadilla adiposa u ortotópica; modelos murinos de metástasis; modelos de ratones transgénicos; y modelos de ratones con desactivación.

20

Por ejemplo, el efecto de la interleucina 17E puede probarse *in vivo* sobre tumores sólidos mediante el uso de ratones que se injertan subcutáneamente de manera bilateral con 30 a 60 mg de un fragmento de tumor, o se implantan con un número adecuado de células cancerosas, el día 0. Los animales que portan tumores se mezclan antes de someterse a los varios tratamientos y controles. En el caso de tratamientos de tumores avanzados, se deja que los tumores se desarrollen hasta un tamaño deseado, los animales que tienen tumores que no se han desarrollado suficientemente se eliminan. Los animales seleccionados se distribuyen de manera aleatoria para someterse a los tratamientos y los controles. Los animales que no portan tumores además pueden someterse a los mismos tratamientos que los animales que portan tumores con el objetivo de ser capaces de disociar el efecto tóxico del efecto específico sobre el tumor. Generalmente la quimioterapia comienza de 3 a 22 días después del injerto, en dependencia del tipo de tumor, y los animales se observan cada día. La interleucina 17E puede administrarse a los animales, por ejemplo, mediante inyección i.p. o infusión en bolo. Los diferentes grupos de animales se pesan aproximadamente 3 o 4 veces a la semana hasta que se alcanza la pérdida de peso máxima, después de lo cual los grupos se pesan al menos una vez por semana hasta el final del estudio.

25

30

Los tumores se miden después de un período de tiempo predeterminado, o pueden monitorearse continuamente al medirlos aproximadamente 2 o 3 veces por semana hasta que el tumor alcanza un tamaño y/o peso predeterminados, o hasta que el animal muere si esto ocurre antes que el tumor alcance el tamaño / peso predeterminados. Después los animales se sacrifican y se evalúa la histología del tejido, el tamaño y / o la proliferación del tumor.

35

Para el estudio del efecto de la interleucina 17E sobre las leucemias, los animales se injertan con un número particular de células, y la actividad antitumoral se determina por el aumento en el tiempo de supervivencia de los ratones tratados con respecto a los controles.

40

Para estudiar el efecto de la interleucina 17E sobre las metástasis tumorales, las células tumorales pueden injertarse en un animal de prueba adecuado que después se trata con interleucina 17E. Alternativamente, las células tumorales pueden tratarse *ex vivo* con interleucina 17E y después inyectarse a un animal de prueba adecuado. La dispersión de las células tumorales del sitio de la inyección se monitorea después en un período de tiempo adecuado.

45

Los efectos tóxicos *in vivo* de la interleucina 17E pueden evaluarse al medir su efecto sobre el peso corporal del animal durante el tratamiento y al realizar los perfiles hematológicos, estudios de patología y análisis de enzimas hepáticas después que el animal se ha sacrificado.

50

55

Tabla 2: Ejemplos de modelos de xenoinjertos de cáncer humano

Modelo de Cáncer	Tipo celular
Ensayo de crecimiento del tumor Xenoinjertos de tumores sólidos humanos en ratones (inyección subcutánea)	Próstata (PC-3, DU145) Mama (MDA-MB-231, MVB-9) Colon (HT-29) Pulmón (NCI-H460, NCI-H209) Pancreático (ASPC-1, SU86.86) Pancreático: resistente a los fármacos (BxPC-3) Piel (A2058, C8161) Cervical (SIHA, HeLa-S3) Cervical: resistente a los fármacos (HeLa S3-HU resistente) Hígado (HepG2) Cerebro (U87-MG) Renal (Caki-1, A498) Ovario (SK-OV-3)
Ensayo de crecimiento tumoral de isoinjertos de tumor humano sólido en ratones (inyección en la almohadilla adiposa)	Mama: resistente a fármacos (MDA-CDDP-S4, MDA-MB435-To.1)
Ensayo de supervivencia	Humano: linfoma de Burkitts (No Hodgkin) (raji)
Modelo de linfoma experimental y leucemia en ratones	Murino: eritroleucemia (CB7 Friend inducido por retrovirus)
Modelo experimental de metástasis pulmonar en ratones	Humano: melanoma (C8161) Murino: fibrosarcoma (R3)

Eficacia de la interleucina 17E en combinación con una o más terapias contra el cáncer

Como se indicó anteriormente, la presente invención contempla el uso de la interleucina 17E en combinación con una o más terapias contra el cáncer como parte de un régimen de terapia de combinación para el tratamiento del cáncer. La eficacia de las combinaciones de interleucina 17E y una o más terapias contra el cáncer puede probarse mediante el uso de técnicas estándar que incluyen las señaladas anteriormente para la interleucina 17E sola. Pueden incluirse controles adicionales en tales ensayos, tal como células tratadas con interleucina 17E sola y/o la(s) terapia(s) contra el cáncer sola con el objetivo de determinar si el efecto de la combinación es mayor que el efecto de la interleucina 17E y/o la terapia contra el cáncer sola.

En una modalidad de la presente invención, el uso de una combinación que comprende interleucina 17E con una o más terapias contra el cáncer es más eficaz que cada uno de los componentes cuando se usan solos. La mejor eficacia puede manifestarse, por ejemplo, como un efecto menor que el aditivo, en donde el efecto de la combinación es mayor que el efecto de cada componente solo, pero menor que la suma de los efectos de los componentes, o puede ser un efecto aditivo, en donde el efecto de la combinación es equivalente a la suma de los efectos de los componentes cuando se usan individualmente, o puede ser un efecto mayor que el aditivo, en donde el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de cada componente usado solo. Los efectos mayores que los aditivos pueden describirse además como sinérgicos.



Dicha mejor eficacia puede resultar en un aumento de la capacidad de la combinación para inhibir el crecimiento tumoral o la proliferación de células neoplásicas cuando se compara con el efecto de cada componente solo y/o en menores dosis de uno o más de los componentes que se requieren para causar un cierto efecto (*es decir* una disminución en la dosis efectiva media o ED<sub>50</sub>), y/o una disminución de los fenómenos de toxicidad asociados con uno o más de los componentes (*es decir* un aumento en la dosis letal media o LD<sub>50</sub>). La mejor eficacia puede resultar además en un mejor índice terapéutico o índice terapéutico clínico de la combinación cuando se compara con el índice terapéutico/índice terapéutico clínico de cada componente solo.

Como se usa en la presente, el término "índice terapéutico" se define como LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>, donde "ED<sub>50</sub>" es la cantidad de un compuesto que produce el 50% de la respuesta o efecto máximo asociado con el compuesto, o la cantidad que produce una respuesta o efecto predeterminado en el 50% de una población de prueba, y "LD<sub>50</sub>" es la cantidad de un compuesto que tiene un efecto letal en el 50% de una población de prueba. Por lo tanto, un compuesto con un alto índice terapéutico puede típicamente administrarse con mayor seguridad que uno con un índice terapéutico bajo. La LD<sub>50</sub> se determina en estudios preclínicos, mientras que la ED<sub>50</sub> puede determinarse en estudios preclínicos o clínicos. Los estudios preclínicos se realizan mediante el uso de un modelo animal adecuado, tal como los descritos en la presente. El índice terapéutico puede determinarse además en base a las dosis que producen un efecto terapéutico y las dosis que producen un efecto tóxico (por ejemplo, la ED<sub>90</sub> y LD<sub>10</sub>, respectivamente).

El "índice terapéutico clínico" difiere de la definición del índice terapéutico en que algunos índices de seguridad relativa o eficacia relativa en pacientes en un escenario clínico no pueden definirse explícitamente y excepcionalmente. Por lo tanto, se considera que una combinación demuestra un mejor índice terapéutico clínico, cuando reúne uno de los siguientes criterios como se define por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA): demuestra mayor seguridad (o aceptación del paciente) en un nivel de eficacia aceptado dentro del intervalo de dosis recomendado, o demuestra un aumento de la eficacia a niveles equivalentes de seguridad (o aceptación del paciente) dentro del intervalo de dosis recomendado, en comparación con cada uno de los componentes en la combinación. Alternativamente, durante los estudios clínicos, la dosis o la concentración (por ejemplo, en solución, sangre, suero, plasma) de un fármaco necesarias para producir efectos tóxicos pueden compararse con la concentración necesaria para lograr los efectos terapéuticos deseados en la población con el objetivo de evaluar el índice terapéutico clínico. Los métodos de los estudios clínicos para evaluar el índice terapéutico clínico son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una modalidad de la presente invención, el uso de una combinación que comprende interleucina 17E y una o más terapias contra el cáncer resulta en sinergia terapéutica, en donde la "sinergia terapéutica" se demuestra cuando una combinación es terapéuticamente superior a uno de los componentes de la combinación cuando se usa en la dosis óptima del componente [como se define en T. H. Corbett y otros, (1982) *Cancer Treatment Reports*,66:1187]. Para demostrar la eficacia de una combinación, puede ser necesario comparar la dosis máxima tolerada de la combinación con la dosis máxima tolerada de cada uno de los componentes por separado en el estudio en cuestión. Esta eficacia puede cuantificarse mediante el uso de técnicas y ecuaciones conocidas comúnmente por los expertos en la técnica [ver, por ejemplo, T. H. Corbett y otros, (1977) *Cancer*, 40, 2660.2680; F. M. Schabel y otros, (1979) *Cancer Drug Development, Part B, Methods in Cancer Research*, 17:3-51, Nueva York, Academic Press Inc.]

#### Composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden interleucina 17E y una o más terapias contra el cáncer y uno o más vehículos, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Si se desea, pueden incluirse otros ingredientes activos en las composiciones. Como se indicó anteriormente, tales composiciones se usan en el tratamiento de varios tipos de cáncer en un sujeto, que incluye un ser humano.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración por una variedad de vías. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para administración oral, tópica, rectal o parenteral o para administración por inhalación o aerosol. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intratecal, inyección intracisternal o técnicas de infusión.

Las composiciones farmacéuticas para uso oral pueden formularse, por ejemplo, como tabletas, trociscos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Tales composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos estándar conocidos en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo de agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables al paladar. La tabletas contienen el ingrediente activo en mezclas con

excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos adecuados que incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y desintegrantes, tales como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, tales como estearato magnésico, ácido esteárico o talco. La tabletas pueden ser no recubiertas, o pueden ser recubiertas por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proporciona una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones farmacéuticas para uso oral pueden presentarse como cápsulas de gelatina duras en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blandas en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio aceitoso tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las composiciones farmacéuticas formuladas como suspensiones acuosas contienen compuesto(s) activos en mezcla con uno o más excipientes adecuados, por ejemplo, con agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hiropropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, hidroxipropilo- $\beta$ -ciclodextrina, goma de tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes tales como fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol por ejemplo, polioxietileno sorbitol monooleato, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol anhídridos, por ejemplo, polietileno sorbitán monooleato. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo etil, o *n*-propilop-hidroxi-benzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes o uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensiones oleosas mediante la suspensión de los compuesto(s) activos en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de maní, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de nuez de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abeja, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como los mencionados anteriormente, y/o agentes aromatizantes se pueden añadir para proporcionar preparaciones orales agradable al paladar. Estas composiciones pueden conservarse por la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como un polvo o gránulos dispersables, los cuales posteriormente pueden usarse para preparar una suspensión acuosa mediante la adición de agua. Tales polvos o gránulos dispersables proporcionan el ingrediente activo en mezcla con uno o más agentes dispersantes o humectantes, agentes de suspensión y/o conservantes. Agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión se ilustran por aquellos ya mencionados anteriormente. En estas composiciones pueden incluirse además excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse además como emulsiones oleoacuosas. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida, o puede ser una mezcla de estos aceites. Los agentes emulsionantes adecuados para la inclusión en estas composiciones incluyen gomas de origen natural, por ejemplo, goma arábiga o goma de tragacanto; fosfátidos de origen natural, por ejemplo, frijol de soya, lecitina; o ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietileno sorbitán. Las emulsiones pueden contener además, opcionalmente, agentes edulcorantes y aromatizantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como un jarabe o elixir al combinar el(los) ingrediente(s) activo(s) con uno o más agentes edulcorantes, por ejemplo glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones pueden además, opcionalmente, contener uno o más agentes emolientes, conservantes, aromatizantes y/o agentes colorantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como una suspensión inyectable estéril acuosa u oleaginosa de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y mediante el uso de uno o más agentes dispersantes o humectantes adecuados y/o de suspensión, tales como los mencionados anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser una suspensión o solución inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse incluyen, pero sin limitarse a, agua, solución de Ringer, solución láctica de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Otros ejemplos incluyen, aceites

fijos, estériles, los cuales se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión, y una variedad de aceites fijos blandos que incluyen, por ejemplo, mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos tales como el ácido oleico se pueden usar además en la preparación de inyectables.

5 Otras composiciones farmacéuticas y métodos para preparar las composiciones farmacéuticas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (con anterioridad "Remingtons Pharmaceutical Sciences"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2000). Las composiciones farmacéuticas de la presente invención descritas anteriormente incluyen interleucina 17E y opcionalmente una o más terapias contra el cáncer en una cantidad eficaz para lograr el propósito deseado. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica. Por ejemplo, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular, o en modelos animales, tales como los descritos en la presente. Los modelos animales se pueden también usar para determinar el intervalo de concentración adecuado y la ruta de administración. Tal información puede usarse después para determinar las dosis útiles y las vías de administración en otros mamíferos, que incluyen humanos mediante el uso de métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica.

#### Usos

20 La presente invención contempla el uso de interleucina 17E para tratar, estabilizar o prevenir el cáncer. En este contexto, la interleucina 17E puede ejercer un efecto citotóxico o citostático que resulta en una reducción en el tamaño de un tumor, el entencimiento o prevención de un aumento en el tamaño de un tumor, un aumento en el tiempo de supervivencia libre de la enfermedad entre la desaparición o eliminación de un tumor y su reaparición, la prevención de una ocurrencia inicial o posterior de un tumor (*por ejemplo* metástasis), un aumento en el tiempo de progresión, la reducción de uno o más síntomas adversos asociados con un tumor, o un aumento en el tiempo de supervivencia general de un sujeto que tiene cáncer. La interleucina 17E puede usarse sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer.

30 En consecuencia, una modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola para el tratamiento de cáncer. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E en combinación con una o más terapias contra el cáncer para el tratamiento del cáncer. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E en combinación con una o más inmunoterapias, una o más quimioterapéuticos, o una combinación de éstos, para el tratamiento del cáncer. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E en combinación con una o más inmunoterapias específicas para el tratamiento del cáncer. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E en combinación con BD-BRM para el tratamiento del cáncer.

35 Los ejemplos de cánceres que pueden ser tratados de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a neoplasias hematológicas, incluyendo leucemias y linfomas; carcinomas, incluyendo adenocarcinomas; melanomas y sarcomas. Carcinomas, adenocarcinomas y sarcomas también se refiere con frecuencia como "tumores sólidos." Los ejemplos de tumores sólidos que ocurren comúnmente incluyen, pero no se limitan a, cáncer de cerebro, mama, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, riñón, pulmón, ovario, páncreas, próstata, estómago y útero, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer colorrectal. Varias formas de linfoma también pueden resultar en la formación de un tumor sólido y, por lo tanto, frecuentemente también se consideran tumores sólidos.

45 El término "leucemia" se refiere de manera general a las enfermedades progresivas, malignas de los órganos formadores de la sangre. La leucemia se caracteriza típicamente por una proliferación y un desarrollo distorsionados de los leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea pero también puede referirse a enfermedades malignas de otras células de la sangre tales como la eritroleucemia, que afecta a los glóbulos rojos inmaduros. Generalmente la leucemia se clasifica clínicamente sobre la base de (1) la duración y el carácter de la enfermedad - aguda o crónica; (2) el tipo de célula en cuestión - mielóide (mielogénica), linfoide (linfogénica) o monocítica, y (3) el aumento o no aumento en el número de células anormales en la sangre-leucémica o aleucémica (subleucémica). La leucemia incluye, por ejemplo, leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T adultas, leucemia aleucémica, leucemia aleucocitémica, leucemia basofilia, leucemia de blastocitos, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutis, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopenia, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielóide, leucemia granulocítica mielóide, leucemia mielomonocítica, leucemia Naegeli, leucemia de células plasmáticas, leucemia

plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia de células indiferenciadas.

5 El término "sarcoma" se refiere generalmente a un tumor que se origina en el tejido conectivo, tal como músculo, hueso, cartilago o grasa, y está compuesto de una sustancia similar al tejido conectivo embrionario y generalmente está compuesto de células estrechamente compactadas incorporadas en una sustancia homogénea o fibrilar. Los sarcomas incluyen sarcomas de tejidos blandos, el condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de la parte blanda alveolar, sarcoma ameloblástico, sarcoma botrioides, sarcoma cloroma, carcinoma chorio, sarcoma embrionario, sarcoma tumor de Wilms, sarcoma endometrial, sarcoma del estroma, sarcoma de Ewing, sarcoma facial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiples idiopático, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, sarcoma seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectásico.

15 El término "melanoma" significa un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y otros órganos. Los melanomas incluyen, por ejemplo, melanoma acral lentiginoso, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma lentigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal y melanoma de extensión superficial.

20 El término "carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento maligno compuesto por células epiteliales que tienden a infiltrarse en los tejidos circundantes y dan lugar a metástasis. Los carcinomas ilustrativos incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma adenoide quístico, carcinoma adenomatoso, carcinoma de la corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelular, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma broncoalveolar, carcinoma bronquiolar, carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma colorrectal, carcinoma coloide, comedocarcinoma, carcinoma corpus, carcinoma cribiforme, carcinoma en cuirasse, carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma de los conductos, carcinoma duro, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epidermoide, carcinoma de adenoides epitelial, carcinoma exofítico, carcinoma ex ulcera, carcinoma fibroso, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células granulosas, carcinoma pelo-matriz, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de Hurthle, carcinoma hialina, carcinoma hipemefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticulare, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, carcinoma molle, carcinoma mucinoso, carcinoma muciparo, carcinoma mucocelular, carcinoma mucopidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma mucosa, carcinoma mixomatoso, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células avenoides, carcinoma de células no pequeñas, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinomas preinvasivos, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultaáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomátodo, carcinoma de Schneider, carcinoma escirroso, carcinoma del escroto, carcinoma de células en anillo de sello, carcinoma simplex, carcinoma de célula pequeña, carcinoma solanoide, carcinoma de células esferoides, carcinoma de células fusiformes, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma del intestino, carcinoma telangiectásico, carcinoma telangiectoides, carcinoma de células de transición, carcinoma tuberoso, carcinoma del túbulo, carcinoma verrugoso y carcinoma veloso.

45 El término "carcinoma" abarca también a los adenocarcinomas. Los adenocarcinomas son carcinomas que se originan en células que componen órganos que tienen propiedades glandulares (secretoras) o que se originan en células que revisten vísceras huecas, tales como el tracto gastrointestinal o el epitelio bronquial. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinomas de la mama, pulmón, colon, páncreas y próstata.

50 Los cánceres adicionales comprendidos en la presente invención incluyen, por ejemplo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores cerebrales primarios, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones cutáneas premalignas, gliomas, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de esófago, cáncer del tracto genitourinario, hipercalcemia maligna, cáncer de endometrio, cáncer adrenal cortical, mesotelioma y meduloblastoma.

Una modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más

5 terapias contra el cáncer en el tratamiento de un tumor sólido. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de un tumor sólido que es una malignidad peritoneal o ginecológica. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de un tumor sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de ovario, oído, nariz y garganta (ENT), cáncer endometrial, cáncer de pulmón, colon y sarcoma de Kaposi.

10 Como el reclutamiento e infiltración de eosinófilos inducidos por interleucina 17E es particularmente eficaz en los tejidos mucosales, una modalidad de la presente invención contempla el uso de interleucina 17E para el tratamiento de los cánceres asociados con el tejido mucosal. En otra modalidad, la presente invención contempla el uso de interleucina 17E para el tratamiento de otros cánceres susceptibles de infiltración eosinófila que incluyen pero sin limitarse a cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de boca, cáncer del esófago, cáncer de próstata y enfermedad de Hodgkin.

15 Una modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, en el tratamiento de melanoma. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de cáncer pancreático. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de cáncer de ovario. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de cáncer de pulmón. Otra modalidad de la presente invención proporciona el uso de interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer en el tratamiento de cáncer de colon. En otra modalidad de la presente invención, la una o más terapias contra el cáncer es una o más inmunoterapias, una o más quimioterapias o una combinación de éstos.

25 De acuerdo con la presente invención, la interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, puede usarse para tratar varias etapas y grados de desarrollo y progresión del cáncer. La presente invención, por lo tanto, contempla el uso de interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, en el tratamiento de los cánceres en etapa temprana que incluyen las neoplasias tempranas que pueden ser pequeñas, de lento crecimiento, localizadas y/o no agresivas, por ejemplo, con la intención de curar la enfermedad o causar la regresión del cáncer, así como también en el tratamiento de etapas intermedias y en el tratamiento de cánceres en etapa tardía que incluyen las neoplasias avanzadas y/o metastásicas y/o agresivas, por ejemplo, para enlentecer la progresión de la enfermedad, para reducir la metástasis o para aumentar la supervivencia del paciente. Similarmente, la interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, puede usarse en el tratamiento de cánceres de grado bajo, cánceres de grado intermedio y/o cánceres de grado alto.

35 La presente invención también contempla que la interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, puede usarse en el tratamiento de cánceres indolentes, cánceres recurrentes que incluyen localmente recurrentes, lejanamente recurrentes y/o cánceres refractarios (es decir cánceres que no responden al tratamiento), cánceres metastásicos, cánceres localmente avanzados y cánceres agresivos. Por lo tanto, un cáncer "avanzado" incluye el cáncer localmente avanzado y el cáncer metastásico y se refiere a la enfermedad evidente en un paciente, en donde dicha enfermedad evidente no es sensible a la cura mediante modalidades de tratamiento locales, tales como cirugía o radioterapia. El término "cáncer metastásico" se refiere al cáncer que se ha propagado de una parte del cuerpo a otra. Los cánceres avanzados pueden ser además no operables, es decir, se han propagado al tejido circundante y no pueden eliminarse quirúrgicamente.

45 Una persona con experiencia en la materia apreciará que muchas de estas categorías pueden superponerse, por ejemplo, los cánceres agresivos típicamente son también metastásicos. "Cáncer agresivo," como se usa en la presente, se refiere a un cáncer de crecimiento rápido. Una persona con experiencia en la materia apreciará que para algunos cánceres, tales como el cáncer de mama o el cáncer de próstata el término "cáncer agresivo" se referirá a un cáncer avanzado que ha recaído dentro de aproximadamente los dos tercios más tempranos del espectro de tiempos de recaída para un cáncer dado, mientras que para otros tipos de cáncer, tales como el carcinoma de células pequeñas del pulmón (SCLC) casi todos los casos presentan cánceres de crecimiento rápido que son considerados agresivos. Por lo tanto el término puede cubrir una subsección de un cierto tipo de cáncer o puede abarcar todos los otros tipos de cáncer.

55 La interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, puede usarse además para tratar cánceres resistentes a fármacos, que incluyen los tumores resistentes a múltiples fármacos. Como se conoce en la materia, la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia es uno de los problemas fundamentales en el manejo del cáncer.

Ciertos cánceres, tales como el cáncer de próstata y el de mama, pueden tratarse mediante terapia hormonal, es decir con hormonas o fármacos anti-hormonas que enlentecen o detienen el crecimiento de ciertos cánceres al bloquear las hormonas naturales del cuerpo. Dichos cánceres pueden desarrollar resistencia, o ser intrínsecamente resistentes, a la terapia hormonal. La presente invención contempla además el uso de interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, en el tratamiento de dichos cánceres "resistentes a hormonas" o "refractarios a hormonas".

La presente invención contempla el uso de interleucina 17E sola, o en combinación con una o más terapias contra el cáncer, como parte de una terapia primaria o una terapia adyuvante. "Terapia primaria" o "terapia de primera línea" se refiere al tratamiento tras el diagnóstico inicial de cáncer en un sujeto. Las terapias primarias ilustrativas pueden involucrar cirugía, una amplia variedad de quimioterapias, inmunoterapia y radioterapia. Cuando una terapia primaria o de primera línea no es quimioterapia sistémica o inmunoterapia, entonces la quimioterapia o inmunoterapia posterior puede considerarse como "terapia sistémica de primera línea." En una modalidad de la presente invención, la interleucina 17E sola o en combinación con una o más terapias contra el cáncer se usa para la terapia sistémica de primera línea.

"Terapia adyuvante" se refiere a una terapia que sigue a una terapia primaria y que se administra a sujetos en riesgo de recaída. La terapia sistémica adyuvante se comienza típicamente poco después de la terapia primaria para retrasar la recurrencia, prolongar la supervivencia o curar a un sujeto. El tratamiento de un cáncer refractario puede denominarse una "terapia de segunda línea" y es un uso contemplado de la presente invención, además de la terapia de primera línea.

La presente invención contempla además el uso de interleucina 17E como un "agente sensibilizante," que inhibe selectivamente el crecimiento de las células cancerosas. En este caso, la interleucina 17E no tiene un efecto citotóxico sobre la célula cancerosa, sino que proporciona un instrumento para debilitar las células cancerosas, y de esta manera facilita el beneficio de las terapias convencionales contra el cáncer.

Como se indicó anteriormente y se muestra en los Ejemplos proporcionados en la presente, la interleucina 17E es capaz de ejercer sus efectos contra el cáncer en ausencia de una respuesta de células T. Como tal, la presente invención contempla el uso de interleucina 17E en sujetos inmunocomprometidos, tales como los que tienen un nivel reducido de células T o de la función de células T. En consecuencia, la presente invención contempla el uso de interleucina 17E para los pacientes con cáncer con niveles variables de inmunocompetencia. Por ejemplo, es bien conocido en la materia que los pacientes con cáncer pueden tener sistemas inmunes suprimidos. Similarmente, los pacientes con SIDA y otros pacientes inmunocomprometidos pueden ser susceptibles al cáncer. Una modalidad de la presente invención, por lo tanto, proporciona el uso de interleucina 17E para tratar el cáncer en pacientes inmunocomprometidos, inmunosuprimidos o inmunoincompetentes.

#### Administración

La interleucina 17E puede administrarse a un sujeto mediante una variedad de vías que incluyen por vía oral, en forma tópica, parenteralmente, por inhalación o aerosol, o por vía rectal/vaginal en formulaciones de dosificación unitaria. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, intratecal, inyección intracisternal o técnicas de infusión. En una modalidad, la interleucina 17E se administra de forma sistémica a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión en el flujo sanguíneo de un sujeto o mediante administración por vía oral. Cuando la interleucina 17E se usa junto con una o más terapias contra el cáncer, la interleucina 17E puede administrarse antes, o después de, la administración de la(s) terapia(s) contra el cáncer, o puede administrarse de forma concomitante. Un experto en la materia apreciará fácilmente que las vías mediante las cuales puede(n) administrarse la(s) terapia(s) contra el cáncer dependerá de la terapia que se use contra el cáncer. Por ejemplo, la(s) terapia(s) contra el cáncer puede(n) administrarse parenteralmente, por inhalación, o mediante administración por vía oral. Las vías de administración, dosis y regímenes de tratamiento adecuados para las terapias estándar contra el cáncer se conocen en la materia.

La presente invención contempla además que un polinucleótido que codifica la interleucina 17E puede administrarse directamente *in vivo*, donde se expresa para producir el polipéptido de interleucina 17E codificado. Los métodos para expresar polipéptidos *in vivo* se conocen en la materia. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) "desnuda" puede inyectarse directamente (Felgner y Rhodes, (1991) Nature 349:351-352; patente de los Estados Unidos núm. 5,679,647) o mediante la inyección de una molécula de ácido nucleico formulada en una composición con uno o más de otros agentes que facilitan la captación de la molécula de ácido nucleico por la célula, tales como saponinas (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 5,739,118) o poliaminas catiónicas (ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 5,837,533); mediante bombardeo de micropartículas (por ejemplo, a través del uso de una "pistola de genes";

5 Biolistic, Dupont); mediante el recubrimiento de la molécula de ácido nucleico con lípidos, receptores de la superficie celular o agentes de transfección; mediante la encapsulación de la molécula de ácido nucleico en liposomas, micropartículas, o microcápsulas; mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un péptido que se conoce que entra al núcleo; o mediante la administración de la molécula de ácido nucleico unida a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (ver, por ejemplo, Wu y Wu, (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432), que puede usarse para dirigirla a tipos celulares que expresan específicamente los receptores. Alternativamente, puede formarse un complejo ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido fusogénico viral para desestabilizar endosomas, lo que permite al ácido nucleico evitar la degradación lisosomal; o la molécula de ácido nucleico puede dirigirse *in vivo* para la captación y expresión específicas por las células al dirigirse a un receptor específico (ver, por ejemplo, Solicitudes de Patentes Internacionales WO 92/06180, WO 92/22635, WO92/20316, WO93/14188 y WO 93/20221). La presente invención contempla además la introducción intracelular de la molécula de ácido nucleico y la posterior incorporación dentro del ADN de la célula huésped para la expresión mediante recombinación homóloga (ver, por ejemplo, Koller y Smithies (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra y otros (1989) Nature 342:435-438).

15 En una modalidad de la presente invención, la terapia contra el cáncer para usar en combinación con la interleucina 17E es BD-BRM. Alternativamente, BD-BRM puede usarse para estimular la producción de interleucina 17E endógena. El intervalo de dosis y la vía de administración para BD-BRM se conoce en la materia. Por ejemplo, BD-BRM puede administrarse por administración intramuscular, por vía oral o intravenosa. Un intervalo de dosificación adecuado para BD-BRM es de aproximadamente 0.01 a 20 mg/kg de peso corporal al día. En el caso de la administración por vía intravenosa, una dosificación de BD-BRM adecuada es aproximadamente 0.05 a 1 mg/kg de peso corporal al día, y en el caso de la administración por vía oral la dosificación es aproximadamente 1 a 5 mg/kg de peso corporal al día. Para la administración intramuscular, puede usarse una dosificación de aproximadamente 0.05 a 0.2 mg/kg de peso corporal al día.

25 La dosificación de interleucina 17E a administrar no está sujeta a límites definidos, pero usualmente será una cantidad eficaz. La interleucina 17E puede formularse en una forma de dosificación unitaria. El término "forma dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Se debe entender que la cantidad real del compuesto a administrar se determinará por un médico a la luz de las circunstancias pertinentes, incluida la afección que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso, y la respuesta de cada paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente.

#### Ensayos clínicos en pacientes con cáncer

35 Una persona con experiencia en la materia apreciará que, después de la eficacia demostrada de la interleucina 17E *in vitro* y en modelos animales, esta debe someterse a estudios de toxicología animal y de farmacocinética con GLP estándar y después entrar en Ensayos Clínicos para evaluar además su eficacia en el tratamiento del cáncer y para obtener la aprobación regulatoria para el uso terapéutico. Como se conoce en la materia, los ensayos clínicos progresan a través de fases de prueba, que se identifican como Fases I, II, III, y IV.

40 Inicialmente, la interleucina 17E seleccionada se evaluará en un ensayo Fase I, que usualmente es un ensayo abierto. Típicamente los ensayos Fase I se usan para determinar el mejor modo de administración (por ejemplo, por píldora o por inyección), la frecuencia de administración, y la toxicidad del polipéptido de interleucina 17E. Los estudios Fase I frecuentemente incluyen pruebas de laboratorio, tales como pruebas de sangre y biopsias, para evaluar los efectos de la interleucina 17E en el cuerpo del paciente. Para un ensayo Fase I, un pequeño grupo de pacientes con cáncer se tratan con una dosis específica del polipéptido de interleucina 17E. Durante el ensayo, la dosis se aumenta típicamente grupo a grupo para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y las toxicidades que limitan la dosis (DLT) asociadas con la interleucina 17E. Este proceso determina una dosis adecuada para usar en un ensayo Fase II posterior.

50 Un ensayo Fase II puede realizarse para evaluar además la eficacia y la seguridad de la interleucina 17E. Los ensayos de Fase II usualmente son abiertos, pero también pueden ser a ciegas. En los ensayos Fase II, la interleucina 17E se administra a grupos de pacientes con un tipo de cáncer específico o con cánceres relacionados, con el uso de la dosificación que se descubrió que era eficaz en los ensayos Fase I.

55 Los ensayos Fase III se enfocan en determinar cómo la interleucina 17E seleccionada se compara con el tratamiento estándar, o de más amplia aceptación. Los ensayos Fase III generalmente son a ciegas. En los ensayos Fase III, los pacientes se asignan de forma aleatoria a uno de dos o más "brazos". En un ensayo con dos brazos, por ejemplo, un brazo

recibirá el tratamiento estándar (grupo control) y el otro brazo recibirá tratamiento con interleucina 17E (grupo de investigación).

5 Los ensayos Fase IV se usan para evaluar además la seguridad a largo plazo y la eficacia de la interleucina 17E. Los ensayos Fase IV son menos comunes que los ensayos Fase I, II y III y tendrán lugar después que la interleucina 17E haya sido aprobada para el uso estándar.

*Elegibilidad de los pacientes para los ensayos clínicos*

10 Los criterios de elegibilidad de los participantes pueden estar en el intervalo de generales (por ejemplo, edad, sexo, tipo de cáncer) a específicos (por ejemplo, tipo y número de tratamientos previos, características del tumor, conteo de células de la sangre, función del órgano). Los criterios de elegibilidad también pueden variar con la fase del ensayo. Por ejemplo, en ensayos Fase I y II, los criterios frecuentemente excluyen pacientes que pueden estar en riesgo por el tratamiento en investigación debido a la función anormal del órgano u otros factores. En ensayos Fase II y III frecuentemente se incluyen  
15 criterios adicionales con respecto al tipo y etapa de la enfermedad, y el número y tipo de tratamientos previos.

Los ensayos Fase I de cáncer usualmente comprenden 15 a 30 participantes para quienes otras opciones de tratamiento no han sido eficaces. Los ensayos Fase II típicamente comprenden hasta 100 participantes que ya han recibido quimioterapia, cirugía, o tratamiento con radiación, pero para los cuales el tratamiento no ha sido eficaz. La participación en ensayos Fase  
20 II frecuentemente se restringe sobre la base del tratamiento previo recibido. Los ensayos Fase III usualmente comprenden de cientos a miles de participantes. Este gran número de participantes es necesario para determinar si existen verdaderas diferencias entre la eficacia de la terapia en evaluación y el tratamiento estándar. La Fase III puede comprender pacientes que están en el intervalo desde los recién diagnosticados con cáncer hasta aquellos con enfermedad extensiva para cubrir la continuidad de la enfermedad.

25 Una persona con experiencia en la materia apreciará que los ensayos clínicos deben diseñarse para ser lo más inclusivos posible sin hacer la población en estudio demasiado diversa para determinar si el tratamiento puede ser tan eficaz sobre una población más estrechamente definida. Mientras más diversa sea la población incluida en el ensayo, más aplicables serán los resultados para la población general, particularmente en ensayos Fase III. La selección de participantes adecuados en  
30 cada fase del ensayo clínico se considera dentro de la experiencia ordinaria de un experto en la materia.

*Evaluación de los pacientes antes del tratamiento*

35 Antes del comienzo del estudio, se pueden usar varias mediciones conocidas en la materia para clasificar primero a los pacientes. Los pacientes pueden evaluarse primero, por ejemplo, mediante el uso de la escala de Estado Funcional (PS) del Grupo Oncológico Cooperativo del Este (ECOG). ECOG PS es un estándar ampliamente aceptado para la evaluación de la progresión de la enfermedad de un paciente medida por el deterioro funcional en el paciente, con ECOG PS 0 que indica no deterioro funcional, ECOG PS 1 y 2 que indican que los pacientes tienen progresivamente mayor deterioro funcional pero aún están ambulatorios y ECOG PS 3 y 4 que indican incapacidad progresiva y falta de movilidad.

40 La calidad de vida general de los pacientes puede evaluarse, por ejemplo, mediante el uso del Cuestionario de Calidad de Vida de McGill (MQOL) (Cohen y otros (1995) Palliative Medicine 9:1 207-219). El MQOL mide los síntomas físicos; el bienestar físico, psicológico y existencial; el soporte; y la calidad de vida general. Para evaluar síntomas tales como náusea, estado de ánimo, apetito, insomnio, movilidad y fatiga puede usarse la Escala de Síntomas de Malestar (SDS) desarrollada por McCorkle y Young ((1978) Cancer Nursing 1: 373-378).

Los pacientes se pueden clasificar además de acuerdo con el tipo y/o etapa de su enfermedad y/o por el tamaño del tumor.

*Monitoreo de la farmacocinética*

50 Para satisfacer los criterios de la Fase I, la distribución de las terapias candidatas se monitorea, por ejemplo, mediante el análisis químico de las muestras, tales como sangre u orina, recolectadas a intervalos regulares. Por ejemplo, las muestras pueden tomarse a intervalos regulares hasta aproximadamente 72 horas después del inicio de la infusión.

55 Si el análisis no se realiza inmediatamente, las muestras pueden colocarse en hielo seco después de la recolección y transportarse posteriormente a un congelador para ser almacenadas a -70 °C hasta que pueda realizarse el análisis. Las muestras pueden prepararse para el análisis mediante el uso de técnicas estándar conocidas en la materia.



Los datos de la farmacocinética pueden generarse y analizarse en colaboración con un farmacólogo clínico experto y usarse para determinar, por ejemplo, el aclaramiento, el tiempo de vida media y la máxima concentración en plasma.

*Monitoreo de los Resultados del Paciente*

5

El punto final de un ensayo clínico es un resultado medible que indica la eficacia de una terapia en evaluación. El punto final se establece antes del comienzo del ensayo y variará en dependencia del tipo y fase del ensayo clínico. Los ejemplos de puntos finales incluyen, por ejemplo, la tasa de respuesta tumoral - la proporción de participantes del ensayo cuyo tumor se redujo en tamaño en una cantidad específica, usualmente descrita como un porcentaje; la supervivencia libre de la enfermedad - la cantidad de tiempo que sobrevive un participante sin ocurrencia o recurrencia de cáncer, usualmente medida en meses; la supervivencia general - la cantidad de tiempo que vive un participante, típicamente medida desde el comienzo del ensayo clínico hasta el momento de la muerte. Para los cánceres avanzados y/o metastásicos, la estabilización de la enfermedad - la proporción de participantes en el ensayo cuya enfermedad se ha estabilizado, por ejemplo, cuyo(s) tumor(es) ha(n) dejado de crecer y/o metastatizar, puede usarse como un punto final. Otros puntos finales incluyen la toxicidad y la calidad de vida.

10

15

20

25

La tasa de respuesta tumoral es un punto final típico en los ensayos Fase II. Sin embargo, incluso si un tratamiento reduce el tamaño del tumor de un participante y alarga el período de supervivencia libre de la enfermedad, puede no alargar la supervivencia general. En tal caso, los efectos secundarios y el fracaso en la prolongación de la supervivencia general pudieran tener más peso que el beneficio de una supervivencia libre de la enfermedad más larga. Alternativamente, la mejora de la calidad de vida de los participantes durante el intervalo libre de tumor pudiera tener más peso que otros factores. Por lo tanto, debido a que las tasas de respuesta tumoral frecuentemente son provisionales y pueden no traducirse en beneficios de supervivencia a largo plazo para el participante, la tasa de respuesta es una medida razonable de la eficacia del tratamiento en un ensayo Fase II, mientras que la supervivencia y calidad de vida del participante se usan típicamente como puntos finales en un ensayo Fase III.

Productos de combinación

30

La presente invención proporciona además productos de combinación que comprenden interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, en combinación con una o más terapias contra el cáncer.

35

Los productos de combinación de la presente invención pueden comprender una o más composiciones. Por ejemplo, el producto de combinación pueden ser una sola composición que comprende interleucina 17E y una o más terapias contra el cáncer. Alternativamente, los productos de combinación pueden comprender una composición que comprende interleucina 17E y una o más composiciones adicionales que comprenden la(s) terapia(s) contra el cáncer. La presente invención contempla además que las composiciones incluidas en el producto de combinación pueden formularse para la administración al sujeto a tratar a través de la misma o de diferentes vías. Similarmente, las composiciones incluidas en el producto de combinación pueden formularse para la administración secuencial o concurrente al sujeto.

40

45

En una modalidad de la presente invención, se proporciona un producto de combinación que comprende interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, en combinación con una o más quimioterapias y/o una o más inmunoterapias. En otra modalidad de la presente invención, se proporciona un producto de combinación que comprende interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, en combinación con una o más inmunoterapias. En otra modalidad de la presente invención, se proporciona un producto de combinación que comprende interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, en combinación con uno o más agentes inmunoterapéuticos no específicos. En otra modalidad de la presente invención, se proporciona un producto de combinación que comprende interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, en combinación con BD-BRM.

Estuches

50

55

La presente invención proporciona además estuches o paquetes terapéuticos que contienen interleucina 17E, o un polinucleótido que codifica la interleucina 17E, y opcionalmente una o más terapias contra el cáncer. Los componentes individuales del estuche pueden empaquetarse en envases separados, asociados con los cuales, cuando sea aplicable, puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos o animales. El estuche puede contener opcionalmente instrucciones o guías que describen el método de uso o el régimen de dosificación para la interleucina 17E y opcionalmente la una o más terapias contra el cáncer.

Cuando los componentes del estuche se proporcionan en una o más soluciones líquidas, la solución líquida puede ser una solución acuosa, por ejemplo una solución acuosa estéril. En este caso el instrumento de envase puede ser en sí mismo un inhalador, una jeringa, una pipeta, un cuentagotas, u otro aparato similar, desde el cual puede administrarse la composición a un paciente o aplicarse a y mezclarse con los otros componentes del estuche.

Los componentes del estuche también pueden proporcionarse en forma seca o liofilizada y el estuche puede contener además un solvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Independientemente del número o el tipo de envases, los estuches de la invención también pueden comprender un instrumento para ayudar a la administración de la composición a un paciente. Dicho instrumento puede ser un inhalador, una jeringa, una pipeta, pinzas, cucharas medidoras, cuentagotas o vehículo de suministro similar aprobado médicamente.

La invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos. Se debe entender que los siguientes ejemplos pretenden describir modalidades de la invención y no pretenden limitar la invención en forma alguna.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1: identificación de II-17E en el suero de ratones tratados con una composición BD-BRM

Se usaron enfoques de proteómica para investigar los cambios en la expresión de proteínas en el suero de ratones que contienen un tumor tratados con una composición BD-BRM.

*Fármacos:* BD-BRM se obtuvo a partir de bilis bovina (derivada de ganado de los Estados Unidos de aproximadamente 24 meses de edad; inspeccionado por la USDA) mediante un proceso estandarizado que incluye precipitación con etanol, purificación por columna, reducción por calor, extracción con éter, y tindalización, que elimina la mayor parte de las sales biliares y péptidos grandes. La composición BD-BRM contiene 5% (p/v) de material sólido y está compuesta por compuestos inorgánicos (95-99% del peso seco) y orgánicos de pesos moleculares de <3000 Daltons (1-5% del peso seco). BD-BRM se formula como una solución inyectable estéril, amortiguada con fosfato sódico monobásico y dibásico.

*Células y Animales:* La línea celular C8161 de melanoma humano se cultivó en medio RPMI 1640 (Wisent Inc., St. Bruno, QC) con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml) (Wisent Inc.) A 37 °C en 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, y se mantuvo con cambios de medio de rutina. Las células C8161 adherentes se pasaron por tripsinización con tripsina al 0.025%. Los ratones desnudos atímicos CD-1 y C57BL/6 (6-8 semanas de edad, 20-25 g, hembras) se compraron de Charles River (Montreal, QC).

*Evaluación de la Actividad Antitumoral en un Modelo Murino de Xenoinjerto de Tumor Humano:* Se establecieron xenoinjertos de tumor humano en ratones. Brevemente, las células tumorales humanas se cosecharon a aproximadamente 80% de confluencia en medio de cultivo celular y se resuspendieron en PBS estéril. Diez millones de células tumorales en 100 µl se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron de forma aleatoria en dos grupos de 10 animales y se trataron con BD-BRM hasta el punto final del experimento. La actividad antitumoral se evaluó y el volumen del tumor se estimó por mediciones con calibrador, mediante el uso de la fórmula: Longitud X Ancho X Altura X/2. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. El porcentaje de inhibición (%) = (peso promedio del tumor de los animales control - peso promedio del tumor del grupo tratado con el fármaco) / peso promedio del tumor de los controles X 100. Un valor p ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

*Electroforesis bidimensional (2-D) en gel:* El suero recolectado de los ratones se preparó con el estuche de proteína sérica Aurum Serum Protein Mini Kit (Bio-Rad) para eliminar albúmina e inmunoglobulina de acuerdo con la instrucción del fabricante. La muestra resultante se diluyó en Amortiguador de Muestra/Rehidratación ReadyPrep (Bio-Rad) y se sometió a electroforesis 2-D en gel. La focalización isoeléctrica en la primera dimensión (IEF) se llevó a cabo en un sistema de celdas Protean de IEF como se describe por el fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las muestras que contenían hasta 20 µg de proteína para geles analíticos se diluyeron hasta 125 µl con solución de deshidratación (8 M urea, CHAPS al 2%, 50 mM ditiotritol, 0.2% (p/v) de anfólitos Bio-Lyte 4/7 (Bio-Rad) y Azul de bromofenol (trazas). Una tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG) pre-fundida (7 cm, pH 4-7, gradiente lineal) (Bio-Rad) se usó para la separación en la primera dimensión. Las tiras se aplicaron mediante rehidratación durante la noche a 50 V. Después se aplicó un gradiente de 250 V a 4000 V durante la noche. Todas las etapas de IEF se llevaron a cabo a 20°C. Después de la IEF en la primera dimensión, las tiras de gel IPG se colocaron en una solución de equilibrio (6 M urea, SDS al 2%, glicerol al 20%, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8) que contiene ditiotritol al 2% (p/v) y se agitaron durante 10 minutos. Después los geles se transfirieron a la solución de equilibrio

que contiene yodoacetamida al 2.5% (p/v) para alquilar los tioles y se agitaron durante 10 minutos adicionales antes de ser colocados en un bloque de gel de poli(acrilamida) al 10%. La separación en la segunda dimensión se llevó a cabo con el uso de amortiguador Tris-glicina que contiene SDS al 10%, a una corriente de 200 V durante 40 minutos.

5 Para la tinción con plata, los geles se sumergieron en metanol: ácido acético: agua (50:5:45) durante 20 minutos seguido de lavar una vez en metanol al 50% y una vez con agua desionizada durante 10 minutos por lavado. Los geles se trataron previamente durante 1 min en una solución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 2% y seguido de 3 lavados de 1 min en agua desionizada. Las proteínas se tiñeron con nitrato de plata al 0.1 % durante 20 min a 4°C, seguido de 2 lavados con agua desionizada durante 10 min por lavado. Los geles se revelaron por incubación en formalina al 0.04% (formaldehído al 35% en agua) en carbonato sódico al 2%. Cuando se logró la intensidad deseada, el revelador se desechó y la reacción se detuvo con ácido acético al 5%. Los patrones de proteínas en el gel después de la tinción con plata se registraron como imágenes digitalizadas mediante el uso de un escáner de alta resolución. La comparación de las imágenes en los geles se hizo con el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

15 *Análisis de Transferencia Western:* La muestra de suero se preparó como se describió anteriormente. La concentración de proteínas en los lisados se cuantificó con un estuche de ensayo de proteínas de Bio-Rad con el uso de albúmina sérica bovina como estándar. Se realizó la transferencia Western. Brevemente, los lisados de proteína total (40 µg/carril) se resolvieron en geles de SDS-poli(acrilamida) al 10% y la proteína se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se trataron con agente de bloqueo, leche desnatada al 5% en solución salina amortiguada con Tris, durante 20 1 h a temperatura ambiente. La expresión de proteínas se detectó posteriormente con anticuerpos primarios contra los diferentes antígenos. Después de lavar con solución salina amortiguada con Tris/Tween 20, tres veces, se añadió un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology y Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ) a una dilución de 1:10,000 y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Las membranas se lavaron y los inmunocomplejos se detectaron mediante el uso de un estuche de reactivo de detección por quimiluminiscencia mejorado (Amersham Biosciences Inc.) y se expusieron a una película Kodak X-OMAT AR para la autoradiografía.

25 *Resultados:* Los ratones que contienen xenoinjerto de C8161 de melanoma humano se trataron por vía intraperitoneal con BD-BRM o PBS durante 4 semanas. Brevemente, las células C8161 de melanoma humano se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos CD-1 como se describió anteriormente. Después a los ratones se les administró por vía i.p. 0.2 ml de PBS o BD-BRM al día cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100 mm<sup>3</sup>. BD-BRM inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo con PBS.

30 Los sueros se recolectaron de los ratones y se analizaron mediante electroforesis 2-D en gel. La Figura 1 muestra los mapas de electroforesis 2-D teñidos con plata de los sueros de ratones tratados con PBS (Figura 1A) o tratados con BD-BRM (Figura 1B). La intensidad de una mancha particular estaba aumentada en el suero de los ratones tratados con BD-BRM (circulada en la Figura 1B) en comparación con los ratones tratados con PBS. Posteriormente esta mancha se extirpó del gel y se analizó por MALDI-TOF después de la digestión en el gel. La proteína se identificó como IL-17E de ratón.

35 La muestra de suero se corrió además en gel de SDS-PAGE y se transfirió a una membrana de PVDF que se sondeó con anticuerpo anti-IL-17E de ratón [anti-IL-17E de ratón (207710; igg2b) de R&D Systems, (Birmingham, AL)]. Como se muestra en la Figura 1C, también se identificó un aumento de IL-17E en ratones tratados con BD-BRM con peso molecular de aproximadamente 23 Kd. El nivel de beta-actina en cada carril era comparable, lo que indica cantidades equivalentes de suero cargadas en los geles. El tamaño de la IL-17E en la transferencia Western es muy similar a la mancha detectada en el gel 2-D teñido con plata.

#### 45 Ejemplo 2: Aumento del Nivel de IL-17E en Suero de Ratones Tratados con una Composición BD-BRM

50 Para confirmar el aumento de la expresión de IL-17E en ratones después del tratamiento con BD-BRM, se recolectaron los sueros de ratones en estudios de eficacia antitumoral de BD-BRM como se describe en el ejemplo previo, y se analizaron para la proteína IL-17E por ELISA. Brevemente, las células C8161 de melanoma humano se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos CD-1. Después a los ratones se les administró por vía i.p. 0.2 ml de PBS (n=8) o BD-BRM (n=9) al día cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100 mm<sup>3</sup>. Al final del experimento se recolectó el suero de los ratones. La IL-17E en los sueros se determinó por ELISA.

55 Como se muestra en la Figura 2, la IL-17E estaba aumentada en los sueros de los ratones tratados con BD-BRM en comparación con los controles con PBS (p<0.001). El nivel de IL-17E se elevó de 3.07 pg/µl en ratones tratados con PBS a 7.73 pg/µl en ratones tratados con BD-BRM. Los datos representan 3 experimentos independientes.

Ejemplo 3: La Composición BD-BRM Induce IL-17E de Células Esplénicas *in vitro*

Los esplenocitos aislados de los ratones tratados con BD-BRM se evaluaron para determinar si BD-BRM era capaz de inducir directamente IL-17E de los esplenocitos.

*Aislamiento de células:* Se obtuvieron suspensiones celulares individuales de células esplénicas, de bazo de ratones C57BL/6, al tamizar y pasar a través de un filtro de células (70 µm; Bectin Dickinson) para separar el tejido fibroso. Los eritrocitos se lisaron con ACK (0.155 M cloruro amónico, 0.1 mM EDTA disódico, 0.01 M bicarbonato potásico, pH 7.3) durante 5 minutos en hielo.

*Estimulación *in vitro*:* Las células se aislaron de ratones C57BL/6. Aproximadamente  $2 \times 10^7$  células/pocillo se sembraron por triplicado en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos después de la lisis de los glóbulos rojos. Las células se trataron con o sin BD-BRM al 5% para varios puntos de tiempo como se indica. En cada punto de tiempo, se cosecharon las células adherentes y no adherentes y se mezclaron para el análisis posterior.

*Transcripción Inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR):* Para la RT-PCR, se aisló ARN mediante el uso de TRIZOL (Invitrogen, Burlington, ON). El ARN total (2-4 µg) se trató con ADNasa I para eliminar cualquier ADN genómico contaminante, y después se le hizo la transcripción inversa a ADNc con el uso de 200 unidades de la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) en presencia de oligonucleótidos (dt)<sub>12-18</sub> de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación de cada ADNc objetivo se realizó con estuches de PCR Jumpstart™ Taq (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900HT de acuerdo con los protocolos proporcionados por el fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos de PCR se cuantificaron fluorométricamente con el uso de SYBR Green (Biorad, Mississauga, ON). La expresión de beta actina en cada muestra se usó como control. Dos conjuntos de iniciadores diferentes se diseñaron y se sintetizaron para cada gen investigado mediante el uso de Primer Express versión 2.0 (Applied Biosystems). Se generó una curva estándar de cada conjunto de iniciadores con el uso de ADN genómico de ratón. Se eligió un conjunto de iniciadores para cada gen para realizar todas las PCR posteriores para asegurar una mejor eficiencia de la PCR y la linealidad de la curva estándar. Los conjuntos de iniciadores utilizados fueron los siguientes:

β-actina directo: TGG CTG AGG ACT TTG TAC ATT GTT [sec. con núm. de ident.:9]

β-actina inverso: GGG ACT TCC TGT AAC CAC TTA TTT CA [sec. con núm. de ident.:10]

IL-17E directo: TGC TGC CCC AGC AAA GAG [sec. con núm. de ident.:11]

IL-17E inverso: GAC ACA GAT GCA GAG CTC CAC TT [sec. con núm. de ident.:12].

*Resultados:* La expresión de IL-17E en esplenocitos de ratones (C57BL/6) normales tratados *in vitro* con BD-BRM durante varios períodos de tiempo, se evaluó en cada punto de tiempo y se examinó por PCR en tiempo real como se describió anteriormente. Brevemente, los esplenocitos se aislaron de ratones C57BL/6, y se sembraron por triplicado en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos después de la lisis de los glóbulos rojos como se describió anteriormente. Las células se trataron con o sin BD-BRM al 5% para varios puntos de tiempo. En cada punto de tiempo, las células adherentes y no adherentes se cosecharon y se mezclaron, el ARN se extrajo mediante el método de Trizol, seguido de la preparación del ADNc. Posteriormente la PCR en tiempo real se realizó a partir del ADNc. Los valores se normalizaron con respecto a los controles de beta actina, y después se compararon con las muestras sin estimular. Los resultados demostraron que BD-BRM indujo la expresión de IL-17E de esplenocitos, que alcanzó su máximo entre 24 y 32 horas después de la estimulación (Figura 3), con un aumento de 1.74 y 1.72 veces en comparación con el grupo tratado con PBS, respectivamente. Hubo una diferencia en la producción de IL-17E de esplenocitos de los ratones tratados con BD-BRM y los ratones tratados con PBS, con valor *p* 0.02 y 0.01 a las 24 y 32 horas después de la estimulación, respectivamente. Los resultados representan 5-6 experimentos por punto de tiempo.

Ejemplo 4: Las Células B y las Células T son Capaces de Producir IL-17E en Respuestaa BD-BRM

Los esplenocitos aislados de ratones C57BL/6 están compuestos de varias poblaciones de células inmunológicas que incluyen células B, células T, macrófagos y células NK. Para determinar cuál(es) tipo(s) celular(es) producía(n) predominantemente IL-17E en esplenocitos tras la estimulación con BD-BRM, se aislaron diferentes poblaciones de células del bazo y se expusieron a BD-BRM.

*Aislamiento de células B y células T:* El aislamiento de células B y T esplénicas se realizó mediante el uso del protocolo Easysep de selección de CD19 positivos para células B, y el protocolo Easysep de selección de CD90.2 positivos para células T (Stemcell Technologies, BC) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los procedimientos produjeron  $\geq$  96% de pureza.

*Análisis por Citometría de Flujo:* Para la tinción del marcador de superficie celular,  $1 \times 10^6$  células/muestra se incubaron con anticuerpos específicos de antígeno en 100  $\mu$ l de solución de tinción (PBS que contiene FCS al 2%) en hielo durante 30 minutos. Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución de tinción y se fijaron con paraformaldehído al 0.5% en PBS. La tinción intracelular de las citocinas se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (eBioscience). Brevemente, después del último lavado, las células se fijaron al añadir 100  $\mu$ l de Solución de fijación durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez en Amortiguador de permeabilización y posteriormente se resuspendieron en Amortiguador de permeabilización durante 5 minutos antes de la adición de anticuerpo anti-citocina. Los anti-IL-17E se conjugaron a biotina, y se usaron a una concentración de 1/20. Después de una incubación de 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, las células se lavaron una vez y se resuspendieron otra vez en Amortiguador de permeabilización, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario, Estreptavidina conjugada a Ficoeritrina-Cy5.5 (eBioscience) durante 20 minutos como se describió previamente. Las células se lavaron una vez más en Amortiguador de permeabilización, se resuspendieron en 0.5 ml de solución de tinción y se almacenaron a 4 °C para el análisis. Las muestras se analizaron por citometría de flujo mediante el uso del programa informático Cellquest (Facsscalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA).

Las células B se aislaron de los esplenocitos y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos con o sin BD-BRM al 5%. Después de 24 horas, las células se cosecharon, la superficie se tiñó con anticuerpos anti-IgM [isotiocianato de fluoresceína (FITC)-anti-IgM de ratón (eb121-15F9; igG2a de eBioscience (San Diego, CA)], seguido de la tinción intracelular con el uso del isotipo control, IgG2b acoplado a biotina o anti-IL-17E acoplado a biotina, seguido de estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE)-Cy5.5. Después las muestras se analizaron por citometría de flujo (Figura 4A). Las células T se aislaron de los esplenocitos con el uso del estuche Easysep de aislamiento de células T murinas, mediante la expresión de CD90.2. Después de 48 horas de cultivo, las células T cosechadas se tiñeron intracelularmente para la IL-17E como se describió anteriormente (Figura 4B).

El análisis por citometría de flujo de la tinción intracelular de células para IL-17E demostró que las células B esplénicas tratadas con BD-BRM durante 24 horas *in vitro* expresaron un mayor nivel de IL-17E en comparación con los controles (24.60% vs 6.57%) (Figura 4A). Las células T esplénicas mostraron además que expresan dIL-17E de forma similar después del tratamiento de 48 horas *in vitro* con BD-BRM (10.64% vs 3.47%) (Figura 4B). Otros tipos celulares, tales como macrófagos y células NK se enriquecieron para el análisis por citometría de flujo, pero IL-17E no se indujo en estas poblaciones tras la exposición a BD.

La alta expresión de IL-17E en células B esplénicas también se observó en ratones desnudos CD-1 que contienen el tumor C8161 que tiene una deficiencia funcional de células T. Brevemente, los ratones desnudos CD1 que contienen xenoinjerto de C8161 de melanoma humano se trataron por vía i.p. Durante 4 semanas con PBS o BD-BRM diariamente (0.2 ml/d/ip). Los esplenocitos se aislaron a partir de bazos individuales, y la superficie se tiñó con anti-IgM seguido de la tinción intracelular de IL-17E. Se tabuló el porcentaje de células teñidas positivas para IL-17E de células clasificadas como IgM+. \* $p=0.04$ ;  $n=5$ . El análisis por citometría de flujo demostró que el porcentaje de células B esplénicas que expresaron IL17E fue mayor en los ratones tratados con BD-BRM en comparación con los ratones tratados con PBS (9.20 vs 13.96 %,  $p=0.04$ ) (Figura 5).

Ejemplo 5: Aumento de Células B Esplénicas Activadas en Ratones Tratados con una Composición BD-BRM

Como se demuestra en los ejemplos precedentes, la producción de IL-17E aumentó en los ratones tratados con BD-BRM y las células B fueron capaces de producir IL-17E. El aumento en células B se examinó en ratones desnudos CD-1 tratados con BD-BRM. Brevemente, los ratones con xenoinjertos de melanoma humano se trataron durante 4 semanas con BD-BRM o PBS, como se describió en los ejemplos precedentes. Los esplenocitos se examinaron por citometría de flujo para células B con el uso de anticuerpos anti-IgM.

*Anticuerpos y reactivos:* Los anticuerpos isotiocianato de fluoresceína (FITC)-anti-IgM de ratón (eb121-15F9; igg2a), ficoeritrina (PE) anti-CD86 de ratón (GL1; igG2a) y PE anti-CD80 de ratón (16-10A1; IgG de hámster) se compraron de eBioscience (San Diego, CA).

*Análisis por citometría de flujo:* La citometría de flujo se realizó como se describió anteriormente. Brevemente, los esplenocitos se aislaron individualmente de ratones desnudos CD1 que contienen el tumor C8161 tratados durante 4 semanas con BD-BRM o PBS. Los glóbulos rojos se eliminaron, seguido de la tinción de la superficie con (A) anticuerpo anti-IgM-FITC o (B) anti-IgM-FITC y anti-CD80-PE+anti-CD86-PE por citometría de flujo.

*Resultados:* Las células B aumentaron significativamente en los bazo de ratones tratados con BD-BRM en comparación con los controles ( $72.84 \pm 1.9$  vs  $65.44 \pm 2.1\%$ ,  $p=0.011$ ) (Figura 6A). Además, al realizar la doble tinción de las células B con los marcadores de activación, CD80 y CD86, también hubo un aumento de las células B activadas en el bazo después del tratamiento con BD-BRM en comparación con el tratamiento con PBS ( $24.37 \pm 2.8$  vs  $16.31 \pm 1.7\%$ ,  $p=0.022$ ) (Figura 6B). Estos resultados demuestran que el tratamiento con BD-BRM resulta en el aumento de células B activadas. Los valores  $p$  para A y B son 0.011 y 0.02 respectivamente;  $n=30$ .

#### Ejemplo 6: BD-BRM Induce Eosinofilia en la Sangre.

Los eosinófilos en la sangre de ratones tratados con BD-BRM se examinaron con el uso del marcador de superficie para el receptor de eotaxina de ratón, CCR3, el que se ha demostrado que se expresa exclusivamente en eosinófilos murinos.

Brevemente, la sangre periférica se aisló individualmente de ratones desnudos CD1 que contienen el tumor C8161 tratados durante 4 semanas con BD-BRM o PBS, como se describió en los ejemplos precedentes. Los glóbulos rojos se eliminaron de la sangre, seguido de la tinción de la superficie con anticuerpo anti-CCR3-PE (83101; igG2a) de R&D Systems, (Birmingham, AL), analizada por citometría de flujo, como se describió anteriormente.

Como se muestra en la Figura 7, mayores porcentajes de células CCR3+ resultaron de los ratones tratados con BD-BRM en comparación con los controles (3.42 vs 7.92%).

#### Ejemplo 7: Aumento de la Infiltración de Eosinófilos en Tumores en Ratones Tratados con una Composición BD-BRM

*Detección histoquímica de eosinófilos y análisis de imágenes asistido por computadora:* Los tumores se extirparon de ratones desnudos CD-1 que contienen xenoinjertos de C8161 de melanoma humano que habían sido tratados con PBS o BD-BRM como se describió en el Ejemplo 1. Los tumores se fijaron en fijador PLP (paraformaldehído al 2% que contiene lisina 0.075 M y solución de peryodato de sodio 0.01 M) durante la noche a 4 °C. Después las muestras se deshidrataron en alcoholes graduados, se incorporaron en parafina de bajo punto de fusión y se cortaron secciones de 5  $\mu$ m en un micrótomos giratorio. Las secciones de parafina se tiñeron para los eosinófilos mediante el uso del método de Rojo Sirio como se describió previamente. Brevemente, las secciones se desparafinizaron, se tiñeron con hematoxilina durante 2 segundos, se diferenciaron en agua destilada y se trataron con etanol al 70% durante 2 segundos, después se tiñeron con solución de rojo de Siria al 0.5% (Sigma) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la deshidratación con concentración creciente de etanol, las secciones se montaron con Permount (Compañía Fisher Scientific).

Los resultados de la histoquímica revelaron que hubo un aumento de la infiltración de eosinófilos en tumores aislados de ratones tratados con BD-BRM en comparación con los controles (Figura 8).

La infiltración de eosinófilos de tumores se analizó además por RT-PCR en tiempo real para los mediadores de eosinófilos, la proteína básica principal (MBP) y la eosinófilo peroxidasa (EPO). Brevemente, ratones desnudos CD-1 que contienen xenoinjerto de C8161 de melanoma humano se trataron por vía i.p. durante 4 semanas con PBS o BD-BRM diariamente (0.2 ml/d/ip). Los tumores se aislaron de los ratones, seguido del aislamiento del ARN y la preparación del ADNc como se describió anteriormente. La PCR en tiempo real se realizó para MBP (Figura 9A) o EPO (Figura 9B). Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a la beta-actina. Los resultados demuestran que ambos marcadores aumentaron en los tumores aislados de ratones tratados con BD-BRM en comparación con los controles de PBS (Figura 9). Esto demostró que BD-BRM indujo el reclutamiento de eosinófilos a los tumores.

#### Ejemplo 8: Inducción de IL-5 en Tumores de Ratones Tratados con una Composición BD-BRM

La expresión de IL-5 y eotaxina se determinó en tumores de ratones tratados con BD-BRM, por medio de RT-PCR como se describió anteriormente. La IL-5 y la eotaxina pueden cooperar para movilizar y reclutar eosinófilos de la médula ósea al tejido a través de la sangre. Además promueven la activación de eosinófilos.

Como se muestra en la Figura 10, la IL-5 (Figura 10A) y la Eotaxina (Figura 10B) aumentaron en tumores de ratones

tratados con BD-BRM como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados demostraron que el reclutamiento de eosinófilos a los tumores de ratones tratados con BD-BRM estaba asociado con la expresión de IL-5 y eotaxina.

Ejemplo 9: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Humana en un Modelo de Xenoinjerto de Melanoma

El papel de la interleucina 17E endógena en la inhibición del crecimiento tumoral como se demuestra en los Ejemplos 1-4 indica que la interleucina 17E tiene actividad contra el cáncer. En consecuencia, la capacidad de la interleucina 17E de inhibir el crecimiento tumoral se examinó como se describe en el siguiente Ejemplo y en los Ejemplos 10-12.

La IL-17E humana recombinante se obtuvo de Peptotech, Inc., y está presente en la preparación como un homodímero de 33.8 kDa de dos cadenas polipeptídicas de 145 aminoácidos unidas por puente disulfuro. La forma predominante de la IL-17E en esta preparación es la forma que inicia en Tir 33 de la secuencia humana proporcionada por el Acceso al GenBank núm. AAG40848. Se implantaron células C8161 de melanoma humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en dos grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento; y

Grupo II: 0.04 mg/kg de IL-17E humana recombinante por vía intraperitoneal (i.p.) Cada dos días hasta el punto final del experimento.

El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El volumen del tumor se determinó mediante el uso de la fórmula (Longitud X Ancho X Altura/2). Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

La IL-17E humana fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS (Figura 11).

Ejemplo 10: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Murina en un Modelo de Xenoinjerto de Cáncer Pancreático

La capacidad de la interleucina 17E murina de inhibir el crecimiento del cáncer pancreático humano se examinó de la siguiente manera. Se implantaron células MIA PaCa-2 de cáncer pancreático humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. La IL-17E murina se obtuvo de R&D Systems, Inc., y está presente en la preparación como un homodímero unido por puente disulfuro. La forma predominante de la IL-17E en esta preparación es la forma que inicia en Val 17 de la secuencia murina proporcionada como Acceso al GenBank núm. NP\_542767. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en dos grupos de 8 animales y se trataron de la siguiente manera:

Grupo I: 200  $\mu$ l de PBS por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento; y

Grupo II: 0.04 mg/kg de IL-17E murina por vía intraperitoneal (i.p.) Cada tercer día hasta el punto final del experimento.

El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El peso del tumor se determinó a partir de tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

La IL-17E murina fue capaz de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS (Figura 12A y B).

Ejemplo 11: Efecto Antitumoral de Dosis-Respuesta de la interleucina 17E humana

El efecto de la dosificación de la IL-17E humana sobre la eficacia antitumoral se examinó mediante el uso de un modelo de xenoinjerto murino de crecimiento tumoral de melanoma humano. Se implantaron células C8161 de melanoma humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en cuatro grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía subcutánea (s.c.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo II: 0.144 mg/kg de IL-17E humana recombinante (Peprtech, Inc.) Por vía subcutánea (s.c.) Cada dos días hasta el punto final del experimento;

5 Grupo III: 0.016 mg/kg de IL-17E humana recombinante por vía subcutánea (s.c.) Cada dos días hasta el punto final del experimento; y

Grupo IV: 0.0018 mg/kg de IL-17E humana recombinante por vía subcutánea (s.c.) Cada dos días hasta el punto final del experimento.

10 Las dosis crecientes de IL-17E humana demostraron un mayor efecto antitumoral contra el crecimiento del melanoma humano, lo que indica un efecto de dosis-respuesta (Figura 13).

Ejemplo 12: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Sola y en Combinación con BD-BRM

15 La eficacia antitumoral de la interleucina 17E sola y en combinación con BD-BRM se examinó mediante el uso de un modelo de xenoinjerto murino de melanoma humano. La línea celular C8161 de melanoma humano fue una donación del Dr. D. R. Welch (Universidad del Estado de Pensilvania, Hershey, PA). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Wisent Inc., St. Bruno, QC) con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 u/ml), estreptomina (100 mg/ml) (Wisent Inc.) A 37 °C a 95%, de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, y se mantuvieron con los cambios de medio de rutina. Las células C8161 adherentes se pasaron por

20 tripsinización con tripsina al 0.025%. Los ratones desnudos atímicos CD-1 y C57BL/6 (6-8 semanas de edad, 20-25 g, hembras) se compraron de Charles River (Montreal, QC). Los protocolos animales cumplían con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en Canadá. La IL-17E murina se obtuvo de R&D Systems, Inc., y está presente en la preparación como un homodímero unido por puente disulfuro. La forma predominante de IL-17E en esta preparación es la forma que inicia en Val 17 de la secuencia murina proporcionada como Acceso al GenBank núm. NP\_542767.

25 Los xenoinjertos de tumor humano se establecieron en ratones de la siguiente manera. Brevemente, las células C8161 de melanoma humano se cosecharon a aproximadamente 80% de confluencia y 10<sup>6</sup> células en 100 µl de PBS se implantaron por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron de forma aleatoria en los cuatro grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

30

Grupo I: 200 µl de PBS por vía intraperitoneal (i.p) al día hasta el punto final del experimento;

35 Grupo II: 200 µl de BD-BRM por vía intraperitoneal (i.p) al día hasta el punto final del experimento;

Grupo III: 1 µg/ratón/día de IL-17E murina por vía intraperitoneal (i.p) al día durante los primeros 10 días después que los tumores alcanzaron un volumen de 50-100mm<sup>3</sup>; y

40 Grupo IV: 1 µg/ratón/día de IL-17E murina por vía intraperitoneal (i.p) al día durante los primeros 10 días después que los tumores alcanzaron un volumen de 59-100mm<sup>3</sup> y 200 ul de BD-BRM por vía intraperitoneal (i.p) al día hasta el punto final del experimento.

45 El volumen del tumor se estimó por mediciones con calibrador, mediante el uso de la fórmula: (Longitud X Ancho X Altura)/2. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. El porcentaje de inhibición (%)= [(peso promedio del tumor de animales controles-peso promedio del tumor del grupo tratado con el fármaco)/(peso promedio del tumor de los controles)] X 100. Un valor p ≤ 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

50 La interleucina 17E tanto sola como en combinación con BD-BRM inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el grupo con PBS (Figura 14A y B).

Ejemplo 13: La interleucina 17E Indujo Eosinofilia en la Sangre en Ratones con Xenoinjerto de Tumor.

55 Para confirmar que el efecto de BD-BRM sobre la eosinofilia en la sangre como se describió en el Ejemplo 6 se debe a la actividad de la interleucina 17E se realizó el siguiente experimento.

Se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la interleucina 17E en ratones induce eosinofilia (Kim y otros (2002) Blood 100:2330-2340). En consecuencia, la sangre de ratones tratados con interleucina 17E sola o en combinación



con BD-BRM se analizó por citometría de flujo para la presencia de eosinófilos mediante la tinción de la superficie con un anticuerpo para el receptor de eotaxina de ratón, CCR3, el que se ha demostrado que se expresa exclusivamente en eosinófilos murinos.

- 5 Brevemente, ratones desnudos CD1 que contienen tumor C8161 se trataron con PBS o interleucina 17E sola o en combinación con BD-BRM como se describió en el Ejemplo 12, y la sangre periférica se aisló individualmente de los ratones. Los glóbulos rojos se eliminaron de la sangre, seguido de la tinción de la superficie con anticuerpo anti-CCR3-PE (83101; igg2a) de R&D Systems, (Birmingham, AL), y análisis por citometría de flujo con el uso del siguiente método.
- 10 Se incubaron  $1 \times 10^6$  células/muestra con el anticuerpo anti-CCR3-PE en 100  $\mu$ l de solución de tinción (PBS que contiene FCS al 2%) en hielo durante 30 minutos. Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución de tinción y se fijaron con paraformaldehído al 0.5% en PBS. Las muestras se analizaron por citometría de flujo mediante el uso del programa informático Cellquest (Facsscalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA).
- 15 Los resultados demostraron que los grupos tratados con IL-17E o IL-17E en combinación con BD-BRM aumentaron significativamente la eosinofilia en la sangre (Figura 15).

Ejemplo 14: La Interleucina 17E Aumenta los Eosinófilos en el Bazo de Ratones con Xenoinjerto de Tumor.

- 20 Se demostró previamente que la sobreexpresión de interleucina 17E en ratones resulta en un aumento significativo de los eosinófilos en los tejidos linfohematopoyéticos que incluyen el bazo (Kim y otros.(2002) Blood 100:2330-2340). En consecuencia, se determinó el número de eosinófilos en el bazo de ratones tratados con interleucina 17E sola o en combinación con BD-BRM.
- 25 Brevemente, se obtuvieron suspensiones celulares individuales de células esplénicas al tamizar y pasar a través de un filtro de células (70  $\mu$ m; Bectin Dickinson) para separar el tejido fibroso. Los eritrocitos se lisaron con ACK (cloruro amónico 0.155 M, EDTA disódico 0.1 mm, bicarbonato potásico 0.01 M, pH 7.3) durante 5 minutos en hielo. Las suspensiones celulares individuales de células esplénicas se analizaron después por citometría de flujo para la presencia de eosinófilos mediante la tinción de la superficie con un anticuerpo para CCR3 con el uso del método como se describió en el Ejemplo 13.
- 30 Se encontró que el porcentaje de células CCR3+ en la población de granulocitos aumentó significativamente en los bazos de ratones tratados con IL-17E o IL-17E en combinación con BD-BRM (Figura 16). Los datos sugieren que la administración de IL-17E resulta en la movilización y el reclutamiento de eosinófilos hacia la sangre y el tejido (es decir Bazo).

35 Ejemplo 15: Aumento de la Infiltración de Eosinófilos en Tumores en Ratones Tratados con Interleucina 17E Sola o en Combinación con una Composición BD-BRM

- Como se describió anteriormente en el Ejemplo 7, el tratamiento de ratones que contienen xenoinjertos de melanoma humano con BD-BRM resultó en el aumento de la infiltración de eosinófilos en el tumor. Para confirmar si este efecto se debe a la actividad de interleucina 17E, se realizó el siguiente experimento.
- 40

*Detección histoquímica de eosinófilos y análisis de imágenes asistido por computadora.* Se extirparon los tumores de ratones desnudos CD-1 que contienen xenoinjertos de C8161 de melanoma humano tratados con PBS o BD-BRM, con o sin IL-17E murina recombinante como se describió anteriormente. Los tumores se fijaron en fijador PLP y secciones de tumores en parafina se prepararon y se tiñeron para eosinófilos con el uso del método Rojo Sirio como se describió anteriormente.

45

Los resultados de la histoquímica mostraron que hubo un aumento de la infiltración de eosinófilos en tumores de ratones tratados con IL-17E o BD-BRM, en comparación con ratones tratados con PBS, como se observa en las microfotografías representativas de las secciones (Figura 17A). La escala de barra en el panel inferior derecho representa 25  $\mu$ m.

50

El número de eosinófilos por milímetro cuadrado de tejido tumoral se determinó por análisis de imágenes asistido por computadora. El análisis de imágenes cuantitativo de los datos obtenidos a partir de seis muestras de tumores por grupo demostró que el número promedio de eosinófilos por campo era 0.5% en el grupo control con PBS, 1.8% en el grupo tratado con BD-BRM, 1.6% en el grupo con IL-17E y 2.0% en el grupo con la combinación BD-BRM + IL-17E. Los resultados revelaron que hubo un aumento significativo en la infiltración de eosinófilos en tumores aislados de ratones tratados con BD-BRM, IL-17E sola o combinación de BD-BRM e IL-17E en comparación con los controles con PBS ( $p < 0.05$ ). Los valores de la media  $\pm$  error estándar se muestran en la Figura 17B ( $*p < 0.05$  en comparación con el control con PBS).

55

Ejemplo 16: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Sola o en Combinación con Dacarbazina (DTIC) en un Modelo de Xenoinjerto de Melanoma

5 La eficacia antitumoral de la interleucina 17E humana sola o en combinación con dacarbazina (DTIC) se examinó en un modelo de xenoinjerto de melanoma. Se implantaron células C8161 de melanoma humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en cinco grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

10 Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo II: 0.04 mg/kg IL-17E murina (R& D Systems, Inc.) por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

15 Grupo III: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo IV: 80 mg/kg dacarbazina por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada 5 días hasta el punto final del experimento; y

20 Grupo V: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días en combinación con 80 mg/kg de dacarbazina por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada 5 días hasta el punto final del experimento.

25 El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

30 La IL-17E sola y en combinación con DTIC inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS. La combinación de IL-17E humana y DTIC tuvo un mayor efecto antitumoral que cualquiera de los agentes solo (Figura 18A y B).

Ejemplo 17: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Humana Sola o en Combinación con Cisplatino en un Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de Ovario

35 La eficacia antitumoral de la interleucina 17E humana sola o en combinación con cisplatino se examinó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario. Se implantaron células SK-OV-3 de cáncer de ovario humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en cuatro grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

40 Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo II: 0.04 mg/kg IL-17E humana (peprotech Inc.) por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

45 Grupo III: 4 mg/kg cisplatino por vía intravenosa (i.v.) Por ratón una vez por semana hasta el punto final del experimento; y

Grupo IV: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días en combinación con 4 mg/kg de cisplatino por vía intravenosa (i.v.) Por ratón una vez por semana hasta el punto final del experimento.

50 El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

55 La IL-17E sola y en combinación con cisplatino inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS. La combinación de IL-17E humana y cisplatino tuvo un mayor efecto antitumoral que cualquiera de los agentes solo (Figura 19).

Ejemplo 18: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Humana Sola o en Combinación con Taxotere® o Tarceva® en un Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de Pulmón

5 La eficacia antitumoral de la interleucina 17E humana sola o en combinación con Taxotere® (docetaxel) o el inhibidor de la cinasa de EGFR Tarceva® (erlotinib) se examinó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón. Se implantaron células H460 de carcinoma de pulmón humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en siete grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

10 Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo II: 0.04 mg/kg IL-17E humana (peprotech Inc.) por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

15 Grupo III: 10 mg/kg Taxotere® por vía intravenosa (i.v.) Por ratón administrado sólo una vez al comienzo del experimento;

Grupo IV: 25 mg/kg Tarceva® por vía oral (p.o.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

20 Grupo V: 100 mg/kg Tarceva® por vía oral (p.o.) Por ratón todos los días durante 5 días, seguido de un período de descanso de una semana, después todos los días durante 5 días;

Grupo VI: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento, en combinación con 10 mg/kg Taxotere® por vía intravenosa (i.v.) Por ratón administrada sólo una vez al comienzo del experimento; y

25 Grupo VII: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días en combinación con 25 mg/kg de Tarceva® por vía oral (p.o.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento.

30 El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

35 La IL-17E sola y en combinación con Taxotere® o Tarceva® inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS. La combinación de IL-17E humana y Taxotere® o Tarceva® tuvo un mayor efecto antitumoral que cualquiera de los agentes solo (Figura 20A y B).

Ejemplo 19: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E Humana Sola o en Combinación con CPT-11 o Avastin en un Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de Colon

40 La eficacia antitumoral de la interleucina 17E humana sola o en combinación con CPT-11 (docetaxel) o el anticuerpo anti-VEGF Avastin® (bevacizumab) se examinó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon. Se implantaron células HT-29 de adenocarcinoma de colon humano ( $10^6$  células en 100  $\mu$ l de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en seis grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

Grupo I: 100  $\mu$ l de PBS por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

50 Grupo II: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo III: 20 mg/kg CPT-11 por vía intravenosa (i.v.) Por ratón todos los días durante 5 días iniciando al comienzo del experimento;

55 Grupo IV: 10  $\mu$ g/kg Avastin® por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento; y

Grupo V: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento, en combinación con 20 mg/kg CPT-11 por vía intravenosa (i.v.) Por ratón todos los días durante 5 días iniciando al comienzo del experimento.

Grupo VI: 0.04 mg/kg IL-17E humana por vía intravenosa (i.v.) Por ratón cada dos días en combinación con 10 µg/kg Avastin® por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento.

- 5 El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.
- 10 La IL-17E sola y en combinación con CPT-11 o Avastin® inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con el PBS. La combinación de IL-17E humana y CPT-11 o Avastin® tuvo un mayor efecto antitumoral que cualquiera de los agentes solo (Figura 21A y B).

Ejemplo 20: Aumento de la Interleucina 5 Sérica en Ratones Tratados con Interleucina 17E

- 15 La expresión de IL-5 en suero se examinó en ratones con injertos de tumor tratados con IL-17E. Ratones desnudos CD1 se injertaron con células C8161 de melanoma humano o células MIA PaCa-2 de cáncer pancreático y se trataron con PBS o IL-17E murina como se describió previamente. Las muestras de suero se recolectaron individualmente de cada ratón en el punto final del experimento, y los niveles de IL-5 se determinaron mediante el ensayo ELISA (BD optEIA; BD Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas del inmunoensayo se recubrieron con anticuerpo monoclonal anti-IL-5 de ratón como un anticuerpo de captura y se incubaron con diluciones seriadas de suero de ratón. Las placas se lavaron tres veces con amortiguador de lavado y se bloquearon durante 1 hr a temperatura ambiente. Las placas se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-IL-5 de ratón biotinilado y conjugado avidina-peroxidasa de rábano picante durante 1 hora, seguido de siete lavados. La solución de sustrato se añadió durante 30 minutos, seguido de la solución de terminación, antes de la medición de la absorbancia (450/570 nm). El análisis estadístico se realizó para comparar los niveles de IL-5. Los valores  $P < 0.05$  se consideraron significativos.
- 20
- 25

Los niveles séricos de IL-5 fueron significativamente mayores en ratones tratados con IL-17E murina en comparación con el PBS en ratones injertados con células de melanoma humano (Figura 22A) o células de cáncer pancreático humano (Figura 22B).

30

Ejemplo 21: Efecto de la Interleucina 17E sobre Eosinófilos y Células B en Bazos de Ratones Tratados con Interleucina 17E

- 35 Se examinó el efecto de la interleucina 17E sobre el aumento del porcentaje de eosinófilos y células B esplénicas y la proporción de células B esplénicas activadas. Los ratones desnudos CD1 injertados con células C8161 de melanoma humano se trataron con PBS, IL-17E murina, o IL-17E humana como se describió previamente. En el punto final del experimento, se aislaron los bazos de los ratones tratados, se tiñeron con marcadores específicos para eosinófilos (CCR3+), células B (IgM+ o CD19+), y activación de células B (CD-80+, CD86+), y se examinaron por citometría de flujo. La citometría de flujo se realizó como se describió anteriormente en el Ejemplo 4.
- 40

El porcentaje de eosinófilos se determinó mediante la tinción de la superficie de la población clasificada como granulocitos con anti-CCR3 de ratón conjugado a ficoeritrina (PE). El porcentaje de células B en el bazo se examinó mediante la tinción de la superficie con anti-CD19 de ratón conjugado a ficoeritrina (PE). La proporción de células B esplénicas activadas se determinó mediante tinción con IgM anti-ratón conjugada a FITC junto con anti-CD80 de ratón conjugado a PE y anti-CD86 de ratón conjugado a PE. El análisis estadístico se realizó para comparar números/activación de eosinófilos y células B. Los valores  $P < 0.01$  se consideraron significativos.

45

Los porcentajes de eosinófilos esplénicos (Figura 23A) y células B esplénicas (Figura 23B) aumentaron significativamente en ratones tratados con IL-17E murina o humana en comparación con el PBS. Además, la proporción de células B activadas en el bazo aumentó significativamente en ratones tratados con IL-17E murina o humana en comparación con el PBS (Figura 23C).

50

Ejemplo 22: Efecto de la Interleucina 17E sobre Números y Activación de Células B en Ratones Injertados con Tumor

- 55 Para confirmar que el efecto de BD-BRM sobre las células B esplénicas como se describió en el Ejemplo 5 se debe a la actividad de la interleucina 17E, se examinó el efecto de la interleucina 17E sobre los números y el estado de activación de las células B esplénicas. Los ratones desnudos CD1 injertados con células C8161 de melanoma humano se trataron con PBS o IL-17E murina como se describió previamente. En el punto final del experimento, se aislaron los bazos de los ratones

tratados, se tiñeron con marcadores específicos para células B (IgM+), y activación de células B (CD-80+, CD86+), y se examinaron por citometría de flujo. La citometría de flujo se realizó como se describió anteriormente en el Ejemplo 4.

5 Los esplenocitos se analizaron para el porcentaje de células B mediante la tinción de la superficie con anticuerpos anti-IgM de ratón conjugados a FITC. Las células B activadas se determinaron mediante la tinción de la superficie con anticuerpos anti-IgM de ratón conjugados a FITC, y anti-CD80 de ratón conjugado a PE y anti-CD86 de ratón conjugado a PE. El análisis estadístico se realizó para comparar números/activación de células B. Los valores  $P < 0.01$  se consideraron significativos.

10 El porcentaje de células B esplénicas (Figura 24A) aumentó significativamente en ratones tratados con IL-17E murina en comparación con el PBS. Además, la proporción de células B activadas en el bazo aumentó significativamente en ratones tratados con IL-17E murina en comparación con el PBS (Figura 24B).

Ejemplo 23: Eficacia Antitumoral de la Interleucina 17E con el uso de Diferente Vías de Administración

15 El efecto de diferentes vías de administración (intraperitoneal e intravenosa) sobre la eficacia antitumoral de la interleucina 17E se examinó mediante el uso de un modelo de xenoinjerto murino de melanoma humano. Se implantaron células C8161 de melanoma humano ( $10^6$  células en  $100 \mu\text{l}$  de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $50\text{-}100 \text{ mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en cuatro grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

- 20 Grupo I: 200 ml de PBS por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento;
- Grupo II: 0.04 mg/kg de IL-17E murina por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón cada dos días hasta el punto final del experimento;
- 25 Grupo III: 200 ml de PBS por vía intravenosa (i.v.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento; y
- Grupo IV: 0.04 mg/kg de IL-17E murina por vía intravenosa (i.v.) Cada dos días hasta el punto final del experimento.

30 El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento.

La IL-17E murina fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral cuando se administró por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Ambas vías de administración mostraron eficacia antitumoral aproximadamente equivalente en comparación con el PBS (Figura 25A y B).

Ejemplo 24: Unión de la Interleucina 17E Humana y Murina al Receptor de Interleucina 17E Murina

40 La capacidad de la interleucina 17E humana y murina de unirse al receptor de IL-17E se examinó mediante el uso de la línea celular pre-B murina 70Z/3 (Paige, C.J., y otros. (1981) Nature 292:631-3).

*Análisis de Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS):*  $1 \times 10^6$  células 70Z/3/muestra se incubaron con IL-17E murina o humana ( $1 \mu\text{g}/10^6$  células) durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Después de lavar dos veces, las células incubadas con IL-17E murina se incubaron con anti-IL17E de ratón en cabra conjugado a biotina y estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE)-Cy5.5. Las células incubadas con IL-17E humana se incubaron con anti-IL17E humana-biotina de cabra conjugado a biotina y estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE)-Cy5.5. Como controles negativos, las células se tiñeron con anticuerpos como se describe sin preincubación con IL-17E humana o murina. Después las muestras se fijaron con paraformaldehído al 0.5% antes del análisis FACS.

50 El análisis FACS reveló que tanto la IL-17E humana como la murina se unen al receptor de IL-17E murina presente en la línea celular pre-B 70Z/3, como se indica en la Figura 26.

Ejemplo 25: Efecto de la Inmunoabsorción de Interleucina 17E sobre la Eficacia Antitumoral

55 Para confirmar aún más que el efecto antitumoral demostrado por la IL-17E murina y humana se debe al polipéptido de IL-17E, se redujo la IL-17E en preparaciones de IL-17E *in vitro* mediante el uso de anticuerpos anti-IL-17E. Las preparaciones de IL-17E inmunoreducidas se usaron después para examinar la eficacia antitumoral mediante el uso de un modelo de xenoinjerto murino de cáncer pancreático humano.

5 *Reducción de IL-17E:* 25  $\mu\text{g}$  de IL-17E murina o humana se reconstituyeron con 200  $\mu\text{l}$  de PBS. Para las muestras anteriores, se eliminó 8  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}$ ) de cada muestra. Se añadió 1  $\mu\text{g}$  de anti-IL17E murina de rata o anti-IL-17E humana de  
 10 cabra a IL-17E murina o IL17E humana, respectivamente, y las muestras se incubaron durante 2 horas con balanceo suave a 4 °C. Posteriormente se añadió 50  $\mu\text{l}$  de proteína A-Sefarosa (1:1 suspensión acuosa), y se mezcló aún más durante otras 2 horas a 4 °C. Las muestras se sedimentaron por centrifugación, y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se realizó una segunda reducción del sobrenadante como se describió anteriormente mediante el uso de anticuerpos y perlas adecuados durante 1 hora a 4 °C con rotación. Las muestras se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE y se analizaron por transferencia Western o tinción con plata para mostrar una reducción en los niveles de IL-17E en muestras inmunoreducidas. Las muestras que tuvieron dos rondas de inmunoreducción de IL-17E (absorbidas dos veces) se usaron en los experimentos de eficacia antitumoral.

15 La capacidad de las muestras de interleucina 17E inmunoreducidas de inhibir el crecimiento de cáncer pancreático humano se examinó de la siguiente manera. Se implantaron células MIA PaCa-2 de cáncer pancreático humano ( $10^6$  células en 100  $\mu\text{l}$  de PBS) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos atímicos CD-1. Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-100  $\text{mm}^3$ , los ratones se separaron de forma aleatoria en seis grupos de 10 animales y se trataron de la siguiente manera:

20 Grupo I: 200  $\mu\text{l}$  de PBS por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento;

Grupo II: 200  $\mu\text{l}$  PBS absorbido dos veces (PBS-D) por vía intraperitoneal (i.p.) Por ratón todos los días hasta el punto final del experimento;

25 Grupo III: 0.04 mg/kg of IL-17E murina por vía intraperitoneal (i.p.) Cada dos días hasta el punto final del experimento;

Grupo IV: 0.04 mg/kg de IL-17E murina absorbida dos veces (mil-17E-D) por vía intraperitoneal (i.p.) Cada dos días hasta el punto final del experimento;

30 Grupo V: 0.04 mg/kg de IL-17E humana por vía intraperitoneal (i.p.) Cada dos días hasta el punto final del experimento; y

Grupo VI: 0.04 mg/kg de IL-17E humana absorbida dos veces (hil-17E-D) por vía intraperitoneal (i.p.) Cada dos días hasta el punto final del experimento.

35 El tamaño de los tumores se midió por mediciones con calibrador en todo el experimento. El peso del tumor se determinó a partir del tejido tumoral extirpado quirúrgicamente del animal en el último día del experimento. Se realizaron pruebas T para evaluar la significación estadística de las diferencias en los tamaños de los tumores. Un valor  $p \leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

40 Las muestras inmunoreducidas de IL-17E murina y humana demostraron reducción de la eficacia antitumoral en comparación con las muestras no inmunoreducidas (Figura 27A y B). El tamaño de los tumores de los ratones tratados con IL-17E no inmunoreducidas fue significativamente diferente al de los ratones tratados con PBS. En comparación, el tamaño de los tumores de los ratones tratados con muestras de IL-17E inmunoreducidas no fueron significativamente diferentes al de los ratones tratados con PBS.

45 Ejemplo 26: Capacidad de la Interleucina 17E de Activar Vías de Señalización en un Modelo de Linfoma de Células B

50 El efecto de la IL-17E sobre la activación de vías de señalización en células B se examinó mediante el uso de la línea celular WEHI-231 de linfoma de células B (Lanier L.L., y otros (1981) J Immunol. 126:626-31). Específicamente, se examinaron el estado de activación de la proteína tirosina cinasa Lyn y de la proteína enlazadora de células B BLNK (Tsubata, T., y otros, (2001) Int Rev Immunol 20:675-8). Un aumento del nivel de las formas fosforiladas de estas proteínas es indicativo de activación.

55 Un total de  $1.5 \times 10^6$  células por muestra se estimularon *in vitro* con 0.21  $\mu\text{g}$  de IL-17E humana o IL17E murina a 37 °C. Las células se lisaron en los puntos de tiempo  $t = 0, 2, \text{ y } 5$  minutos en amortiguador de lisis durante 30 minutos en hielo, seguido de centrifugación durante 10 minutos. Las muestras que contenían aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  de proteína se separaron por SDS-PAGE, seguido de la transferencia a membranas para la transferencia Western.

Para la detección de BLNK fosforilada, las membranas de Western se incubaron con anticuerpos de conejo anti-fosfo-BLNK, seguido de anticuerpos anti-conejo conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP).

5 Para la detección de Lyn, las membranas de Western se incubaron con anticuerpos de conejo anti-Lyn, seguido de anticuerpos anti-conejo conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP). Todas las membranas se expusieron a una película de autoradiografía y se revelaron para detectar las proteínas de interés por quimiluminiscencia.

10 Para evaluar la equivalencia en la carga de proteína entre los carriles en ambos experimentos, las membranas se despojaron de anticuerpos y se incubaron con anticuerpos de ratón anti-GAPDH y anticuerpos anti-ratón conjugados a HRP, seguido de la detección basada en quimiluminiscencia.

15 Resultados: Los niveles de la proteína BLNK fosforilada y de la proteína Lyn fosforilada aumentaron en células WEHI-231 después de la incubación con IL-17E humana o murina, como se indica por flechas en las figuras (Figura 28A y C). Los niveles de las formas fosforiladas de ambas proteínas aumentaron en el transcurso del tiempo. La equivalencia de la carga de proteína entre los carriles se demuestra en las Figuras 28B y D.

Ejemplo 27: Capacidad de la Interleucina 17E de Promover la Interacción del Receptor de Interleucina 17E con la Proteína Tirosina Cinasa Lyn en un Modelo de Linfoma de Células B

20 El efecto de la interleucina 17E sobre la inducción de la interacción de su receptor IL17BR con la proteína tirosina cinasa Lyn se examinó mediante el uso de la línea celular WEHI-231 de linfoma de células B.

25 Un total de  $5 \times 10^6$  células por muestra se incubaron con  $0.1 \mu\text{g}$  de IL17E humana (hil-17E) durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se lisaron en amortiguador de lisis durante 30 minutos en hielo, seguido de centrifugación durante 10 minutos. La tirosina cinasa Lyn se inmunoprecipitó a partir de  $350 \mu\text{g}$  de lisado de proteínas mediante el uso de anticuerpos de conejo anti-Lyn acoplados a perlas de proteína A Sefarosa. Las muestras inmunoprecipitadas que contenían aproximadamente  $25 \mu\text{g}$  de proteína se separaron por SDS-PAGE, seguido de la transferencia a membranas para la transferencia Western.

30 Para la detección de Lyn fosforilada, las membranas se incubaron con anticuerpos anti-fosfotirosina, seguido de anticuerpos anti-ratón conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP).

35 Para la detección de IL17BR, las membranas se incubaron con anticuerpos de rata anti-IL17BR conjugados a biotina, seguido de estreptavidina conjugada a HRP.

Para evaluar la equivalencia de la carga de Lyn, las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo anti-Lyn, seguido de anticuerpos anti-conejo conjugados a HRP.

40 Todas las membranas se expusieron a una película de autoradiografía y se revelaron para detectar quimiluminiscencia.

Resultados: Lyn y IL17BR coimmunoprecipitaron a partir de células WEHI-231 después de la exposición de las células a IL-17E humana, lo que indica que estas proteínas interactúan en respuesta a la IL-17E (Figura 29A y B). La equivalencia de la carga de proteína Lyn entre los carriles se demuestra en la Figura 29C.

Ejemplo 28: Capacidad de la Interleucina 17E de Activar la Vía NF-kappa B

50 La capacidad de la interleucina 17E humana y murina de activar proteínas en la vía del Factor Nuclear-kappa B (NF-kappa B) se examinó mediante el uso de la línea celular WEHI-231 de linfoma de células B. La IL-17E murina había mostrado previamente activar la vía NF-kappa B (Lee, J., y otros, (2001) J Biol Chem 276:1660-4). La activación de la vía NF-kappa B se evaluó por el aumento de la fosforilación de la proteína I-kappa B alfa. La I-kappa B alfa no fosforilada forma un complejo con NF-kappa B en el citoplasma celular en un estado inactivo en células no estimuladas. La activación de NF-kappa B está asociada con la fosforilación de I-kappa B alfa en respuesta a ciertos estímulos.

55 Un total de  $5 \times 10^6$  células por muestra se estimularon con  $0.7 \mu\text{g}$  de IL-17E humana (hil-17E) o IL-17E murina (mil-17E) a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se lisaron en los puntos de tiempo  $t = 0, 2, \text{ y } 5$  minutos en amortiguador de lisis durante 30 minutos en hielo, seguido de centrifugación durante 10 minutos. Las muestras que contenían aproximadamente  $40 \mu\text{g}$  de proteína se separaron por SDS-PAGE, seguido de la transferencia a membranas para la transferencia Western.

Las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo anti-fosfo-ikappab-alfa, seguido de anticuerpos anti-conejo conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP). Las membrana se expusieron a una película de autoradiografía y se revelaron para detectar la ikb fosforilada (a aproximadamente 41 kD) por quimiluminiscencia.

5

Para evaluar la equivalencia en la carga de proteína entre los carriles en ambos experimentos, las membranas se despojaron de anticuerpos y se incubaron con anticuerpos de ratón anti-GAPDH y anticuerpos anti-ratón conjugados a HRP, seguido de la detección basada en quimiluminiscencia.

10

Resultados: Los niveles de ikappab alfa fosforilada (p-ikB- $\alpha$ ) aumentaron en células WEHI-231 después de la incubación con IL-17E humana o murina, como se indica en la Figura 30A. Se muestra la equivalencia de la carga de GAPDH entre los carriles (Figura 30B).

15

Aunque la invención se ha descrito con referencia a ciertas modalidades específicas, varias modificaciones de las mismas resultarán evidentes para los expertos en la materia como se describe en las reivindicaciones anexas a esta.

LISTADO DE SECUENCIAS

20

<110> Lorus terapias Inc. y otros

<120> Uso de interleucina 17E para el tratamiento del cáncer

<130> 335-170PCT

25

<140> N/A

<141> 2006-03-08

<160> 12

30

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

35

<213> Homo sapiens

<400> 1

40

Met Arg Glu Arg Pro Arg Leu Gly Glu Asp Ser Ser Leu Ile Ser Leu  
1 5 10 15

Phe Leu Gln Val Val Ala Phe Leu Ala Met Val Met Gly Thr His Thr  
20 25 30

Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser  
35 40 45

45

Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro  
50 55 60

Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly  
65 70 75 80

Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg  
85 90 95

50

Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys  
100 105 110

Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly  
115 120 125

Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro  
130 135 140

55

Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg  
145 150 155 160

Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met  
165 170 175

Gly



ES 2 533 970 T3

5 <210> 2  
 <211> 161  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

10 Met Tyr Gln Val Val Ala Phe Leu Ala Met Val Met Gly Thr His Thr  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser  
 20 25 30  
 15 Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro  
 35 40 45  
 Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly  
 50 55 60  
 Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg  
 65 70 75 80  
 20 Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys  
 85 90 95  
 Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly  
 100 105 110  
 Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro  
 115 120 125  
 25 Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg  
 130 135 140  
 Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met  
 145 150 155 160  
 30 Gly

35 <210> 3  
 <211> 161  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 3

45

50

55

5 Met Tyr Gln Val Val Ala Phe Leu Ala Met Val Met Gly Thr His Thr  
 1 5 10 15  
 Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser  
 20 25 30  
 Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro  
 35 40 45  
 10 Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly  
 50 55 60  
 Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys  
 85 90 95  
 15 Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly  
 100 105 110  
 Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro  
 115 120 125  
 Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg  
 130 135 140  
 20 Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met  
 145 150 155 160  
 Ala

25

30 <210> 4  
 <211> 1335  
 <212> ADN.  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 4

ggcttgctga aaataaaatc aggactccta acctgctcca gtcagcctgc ttccacgagg 60  
 cctgtcagtc agtgccecgac ttgtgactga gtgtgcagtg cccagcatgt accaggtcag 120  
 40 tgcagagggc tgccctgagg ctgtgctgag agggagagga gcagagatgc tgctgagggt 180  
 ggaggggagg caagctgccca gggttggggc tgggggcca gtggagtgag aaactgggat 240  
 cccaggggga ggggtgcagat gaggagcga cccagattag gtgaggacag ttctctcatt 300  
 agccttttcc tacaggtggt tgcattcttg gcaatggtca tgggaacca cacctacagc 360  
 cactggccca gctgctgccc cagcaaaggg caggacacct ctgaggagct gctgaggtgg 420  
 agcactgtgc ctgtgectcc cctagagcct gctaggccca accgccacc agagtctgt 480  
 45 agggccagtg aagatggacc cctcaacagc agggccatct cccoctggag atatgagttg 540  
 gacagagact tgaaccggct cccccaggac ctgtaccacg cccgttgccct gtgcccgcac 600  
 tgcgtcagcc tacagacagg ctcccacatg gacccccggg gcaactcgga gctgctctac 660  
 cacaaccaga ctgtcttcta caggcgcca tgccatggcg agaagggcac ccacaagggc 720  
 tactgcctgg agcgcaggct gtaccgtggt tccttagctt gtgtgtgtgt gggccccgt 780  
 gtgatgggct agccggacct gctggaggct ggtccctttt tgggaaacct ggagccaggt 840  
 50 gtacaaccac ttgccatgaa gggccaggat gccagatgc ttggcccctg tgaagtgctg 900  
 tctggagcag caggatcccg ggacaggatg gggggctttg gggaaaacct gcacttctgc 960  
 acattttgaa aagagcagct gctgcttagg gccgcccggaa gctgggtgtcc tgtcattttc 1020  
 tctcaggaaa ggttttcaaa gttctgcca tttctggagg ccaccactcc tgtctcttcc 1080  
 tcttttccca tcccctgcta cctggccca gcacaggcac tttctagata tttccccctt 1140  
 55 gctggagaag aaagagcccc tggttttatt tgtttgttta ctcatcactc agtgagcadc 1200  
 tactttgggt gcattctagt gtagttacta gtcttttgac atggatgatt ctgaggagga 1260  
 agctgttatt gaatgtatag agatttatcc aaataaatat ctttatttaa aatgaaaaa 1320  
 aaaaaaaaa aaaaa 1335

ES 2 533 970 T3

5 <210> 5  
 <211> 644  
 <212> ADN.  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5  
 ctcaagtcac tccctaaaaa gacagtggaa ataaatttga ataaacaaaa caggettgtct 60  
 gaaaataaaa tcaggactcc taacctgtct cagtcagcct gcttccacga ggctgtcag 120  
 tcagtgtccc acttgtgact gagtgtgcag tgcccagcat gtaccagggtg gttgcattct 180  
 tggcaatggt catgggaacc cacacctaca gccactggcc cagctgtctgc cccagcaaag 240  
 15 ggcaggacac ctctgaggag ctgctgaggt ggagcactgt gcctgtgcct cccctagagc 300  
 ctgctaggcc caaccgccac ccagagtcct gtagggccag tgaagatgga cccctcaaca 360  
 gcagggccat ctccccctgg agatatgagt tggacagaga cttgaaccgg ctccccagg 420  
 acctgtacca cgcccgttgc ctgtgcccg actgcgtcag cctacagaca ggctcccaca 480  
 tggacccccg gggcaactcg gagctgtctc accacaacca gactgtcttc taccggcggc 540  
 20 catgccatgg cgagaagggc accacaagg gctactgcct ggagcgcagg ctgtaccgtg 600  
 tttccttagc ttgtgtgtgt gtgcggcccc gtgtgatggg ctag 644

25 <210> 6  
 <211> 486  
 <212> ADN.  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 6  
 atgtaccagg tggttgcatt cttggcaatg gtcattggaa cccacaccta cagccactgg 60  
 cccagctgct gcccagcaa agggcaggac acctctgagg agctgctgag gtggagcact 120  
 gtgcctgtgc ctcccctaga gcctgctagg cccaaccgcc acccagagtc ctgtagggcc 180  
 35 agtgaagatg gaccctcaa cagcagggcc atctccccct ggagatatga gttggacaga 240  
 gacttgaacc ggctccccca ggacctgtac cacgcccgtt gcctgtgccc gactgcgctc 300  
 agcctacaga caggctccca catggacccc cggggcaact cggagctgct ctaccacaac 360  
 cagactgtct tctaccggcg gccatgccat ggcgagaagg gcaccacaa gggctactgc 420  
 ctggagcgca ggetgtaccg tgtttccttg gcttgtgtgt gtgtgcggcc cggggtcatg 480  
 gcttag 486

45 <210> 7  
 <211> 169  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 7

50

55

5 Met Tyr Gln Ala Val Ala Phe Leu Ala Met Ile Val Gly Thr His Thr  
 1 5 10 15  
 Val Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gly Cys Ser His Leu Pro Ser Cys Cys  
 20 25 30  
 Pro Ser Lys Glu Gln Glu Pro Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Ser Ser  
 35 40 45  
 10 Ala Ser Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Ser His Thr His His Ala Glu  
 50 55 60  
 Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp  
 85 90 95  
 15 Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr  
 100 105 110  
 Gly Ser His Met Asp Pro Leu Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn  
 115 120 125  
 20 Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Glu Gly Thr His  
 130 135 140  
 Arg Arg Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys  
 145 150 155 160  
 Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met Ala  
 165  
 25

<210> 8  
 <211> 985  
 30 <212> ADN.  
 <213> Mus musculus  
 <400> 8

35  
 atgtaccagg ctgttgcatt cttggcaatg atcgtgggaa cccacaccgt cagcttgagg 60  
 atccaggagg gctgcagtca cttgcccagc tgctgccccca gcaagagca agaaccctcg 120  
 40 gaggagtggc tgaagtggag ctctgcatct gtgtcccccc cagagcctct gagccacacc 180  
 caccacgcag aatcctgcag ggccagcaag gatggccccc tcaacagcag ggccatctct 240  
 ccttgagct atgagtggg cagggacttg aatcgggtcc cccaggacct gtaccacgct 300  
 cgatgcctgt gccacactg cgtcagccta cagacaggct cccacatgga cccgctgggc 360  
 aactccgtcc cactttacca caaccagacg gtctttacc ggcggccatg ccatggtgag 420  
 45 gaaggtaccc atcggcgcta ctgctggag cgcaggctct accgagtctc cttggcttgt 480  
 gtgtgtgtgc ggccccgggt catggcttag tcatgctcac cacctgcctg aggetgatgc 540  
 ccggttggga gagaggcca ggtgtacaat caccttgcca atgcgggccc ggttcaagcc 600  
 ctccaaagcc ctacctgaag cagcaggctc ccgggacaag atggaggact tggggagaaa 660  
 ctctgacttt tgcacttttt ggaagcactt ttgggaagga gcaggttccg cttgtgctgc 720  
 tagaggatgc tgttgtggca tttctactca ggaacggact ccaaaggcct gctgaccctg 780  
 50 gaagccatac tcctggctcc tttccctga atcccccaac tcctggcaca ggcactttct 840  
 ccacctctcc ccctttgcct tttgttgtgt ttgtttgtgc atgccaactc tgcgtgcagc 900  
 caggtgtaat tgccttgaag gatggttctg aggtgaaagc tgttatcgaa agtgaagaga 960  
 tttatccaaa taaacatctg tgttt 985

55 <210> 9  
 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> iniciador directo b-actina  
  
 <400> 9  
 tgctgagga cttgtacat tgtt 24  
  
 10 <210> 10  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> iniciador inverso b-actina  
  
 <400> 10  
 20 gggacttct gtaaccactt attca 26  
  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> iniciador directo IL-17E  
  
 <400> 11  
 30 tgctgcccc gcaaagag 18  
  
 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> iniciador inverso IL-17E  
  
 <400> 12  
 40 gacacagatg cagagctcca ctt 23

Reivindicaciones

1. Interleucina 17E (IL-17E) para usar en el tratamiento de cáncer en un sujeto que lo necesita, en donde dicha IL-17E se proporciona como un polipéptido de IL-17E o como un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E.
- 5 2. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha IL-17E inhibe crecimiento tumoral en dicho sujeto.
3. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha IL-17E estimula la infiltración de eosinófilos en un tumor en dicho sujeto.
- 10 4. IL-17E para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer es un tumor asociado con un tejido de la mucosa.
5. IL-17E para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho cáncer es un tumor de colon, tumor de mama, tumor de ovario, tumor cervical, tumor endometrial, tumor de pulmón, tumor gástrico, tumor oral, tumor de esófago, tumor de próstata o linfoma de Hodgkin.
- 15 6. IL-17E para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho cáncer es un tumor sólido.
7. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho tumor sólido es un melanoma, un tumor pancreático, un tumor de ovario, un tumor de pulmón, un tumor de mama o un tumor de colon.
- 20 8. IL-17E para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho uso es en combinación con una o más terapias contra el cáncer.
- 25 9. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha una o más terapias contra el cáncer es uno o más de los fármacos quimioterapéuticos, una o más inmunoterapias, o una combinación de éstos.
- 30 10. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una quimioterapia.
- 31 11. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha quimioterapia es una quimioterapia de amplio espectro.
- 35 12. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una inmunoterapia.
13. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la inmunoterapia es una inmunoterapia no específica, no citocina o un anticuerpo monoclonal.
- 40 14. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es dacarbazina, cisplatino, docetaxel, erlotinib, paclitaxel, gemcitabina, CPT-11 o bevacizumab.
- 45 15. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM), dicha composición BD-BRM comprende componentes de poco peso molecular de menos que 3000 daltons y tiene las siguientes propiedades:
  - (i) se extrae de la bilis de animales;
  - (ii) es capaz de estimular monocitos y/o macrófagos *in vitro* y/o *in vivo*;
  - (iii) es capaz de modular la producción y/o liberación del factor de necrosis tumoral;
  - 50 (iv) no contiene ningún nivel apreciable de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-4, GM-CSF o IFN- $\gamma$ ;
  - (v) no es citotóxica para las células mononucleares de sangre periférica humana, y
  - (vi) no es una endotoxina.
- 55 16. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un melanoma, y dicha una o más terapias contra el cáncer es dacarbazina.

17. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un tumor de páncreas, y dicha una o más terapias contra el cáncer es gemcitabina.
- 5 18. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un tumor de ovario, y dicha una o más terapias contra el cáncer es cisplatino.
19. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un tumor de pulmón, y dicha una o más terapias contra el cáncer es docetaxel o erlotinib.
- 10 20. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un tumor de mama, y dicha una o más terapias contra el cáncer es cisplatino o paclitaxel.
21. IL-17E para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho cáncer es un tumor de colon, y dicha una o más terapias contra el cáncer es CPT-11 o bevacizumab.
- 15 22. Uso de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un sujeto.
23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicho polipéptido de IL-17E inhibe el crecimiento tumoral en dicho sujeto.
- 20 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en donde dicho polipéptido de IL-17E estimula infiltración de eosinófilos en un tumor en dicho sujeto.
- 25 25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde dicho cáncer es un tumor asociado con un tejido de la mucosa.
26. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde dicho cáncer es un tumor de colon, tumor de mama, tumor de ovario, tumor cervical, tumor endometrial, tumor de pulmón, tumor gástrico, tumor oral, tumor de esófago, tumor de próstata o linfoma de Hodgkin.
- 30 27. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en donde dicho cáncer es un tumor sólido.
28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicho tumor sólido es un melanoma, un tumor pancreático, un tumor de ovario, un tumor de pulmón, un tumor de mama o un tumor de colon.
- 35 29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en donde dicho uso es en combinación con una o más terapias contra el cáncer.
- 40 30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha una o más terapias contra el cáncer es uno o más de los fármacos quimioterapéuticos, una o más inmunoterapias, o una combinación de éstos.
- 45 31. El uso de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una quimioterapia.
32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en donde dicha quimioterapia es una quimioterapia de amplio espectro.
33. El uso de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una inmunoterapia.
- 50 34. El uso de acuerdo con la reivindicación 33, en donde dicha inmunoterapia es una inmunoterapia no específica, no citocina o un anticuerpo monoclonal.
- 55 35. El uso de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es dacarbazina, cisplatino, docetaxel, erlotinib, paclitaxel, gemcitabina, CPT-11 o bevacizumab.

36. El uso de acuerdo con la reivindicación 29 o 30, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) , dicha composición BD-BRM comprende componentes de poco peso molecular de menos que 3000 daltons y tiene las siguientes propiedades:
- 5 (i) se extrae de la bilis de animales;  
(ii) es capaz de estimular monocitos y/o macrófagos *in vitro* y/o *in vivo*;  
(iii) es capaz de modular la producción y/o liberación del factor de necrosis tumoral;  
(iv) no contiene ningún nivel apreciable de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-4, GM-CSF o IFN- $\gamma$ ;  
10 (vii) no es citotóxica para las células mononucleares de sangre periférica humana, y  
(viii) no es una endotoxina.
37. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un melanoma, y dicha una o más terapias contra el cáncer es dacarbazina.
- 15 38. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un tumor de páncreas, y dicha una o más terapias contra el cáncer es gemcitabina.
39. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un tumor de ovario, y dicha una o más terapias contra el cáncer es cisplatino.
- 20 40. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un tumor de pulmón, y dicha una o más terapias contra el cáncer es docetaxel o erlotinib.
41. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un tumor de mama, y dicha una o más terapias contra el cáncer es cisplatino o paclitaxel.
- 25 42. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho cáncer es un tumor de colon, y dicha una o más terapias contra el cáncer es CPT-11 o bevacizumab.
- 30 43. Un producto de combinación que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido de interleucina 17E (IL-17E) o un polinucleótido que codifica un polipéptido de IL-17E y una o más terapias contra el cáncer.
44. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 43, en donde dicha una o más terapias contra el cáncer es uno o más fármacos quimioterapéuticos, una o más inmunoterapias, o una combinación de éstos.
- 35 45. El producto de combinación de acuerdo con 43 o 44, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una quimioterapia.
46. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 45, en donde dicha quimioterapia es una quimioterapia de amplio espectro.
- 40 47. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una inmunoterapia.
- 45 48. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 47, en donde la inmunoterapia es una inmunoterapia no específica, no citocina o un anticuerpo monoclonal.
49. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es dacarbazina, cisplatino, docetaxel, erlotinib, paclitaxel, gemcitabina, CPT-11 o bevacizumab.
- 50 50. El producto de combinación de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, en donde al menos una de dichas terapias contra el cáncer es una composición modificadora de la respuesta biológica derivada de la bilis (BD-BRM) , dicha composición BD-BRM comprende componentes de poco peso molecular de menos que 3000 daltons y tiene las siguientes propiedades:
- 55 (i) se extrae de la bilis de animales;  
(ii) es capaz de estimular monocitos y/o macrófagos *in vitro* y/o *in vivo*;  
(iii) es capaz de modular la producción y/o liberación del factor de necrosis tumoral;



- (iv) no contiene ningún nivel apreciable de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6, IL-8, IL-4, GM-CSF o IFN- $\gamma$ ;
- (ix) no es citotóxica para las células mononucleares de sangre periférica humana, y
- (x) no es una endotoxina.

- 5 **51.** El producto de combinación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 50 para usar en el tratamiento del cáncer.

FIGURA 1

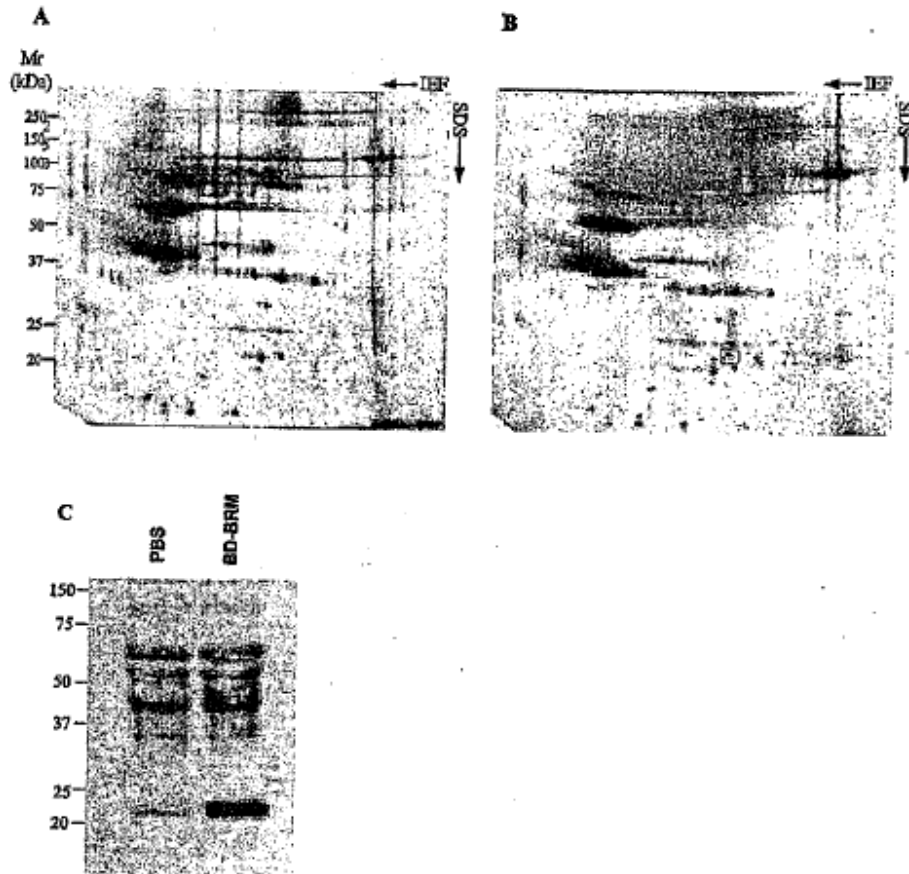


FIGURA 2

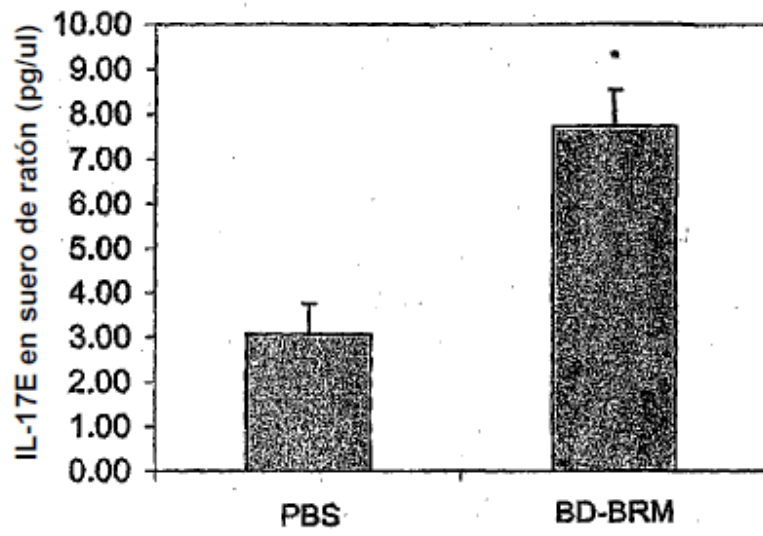


FIGURA 3

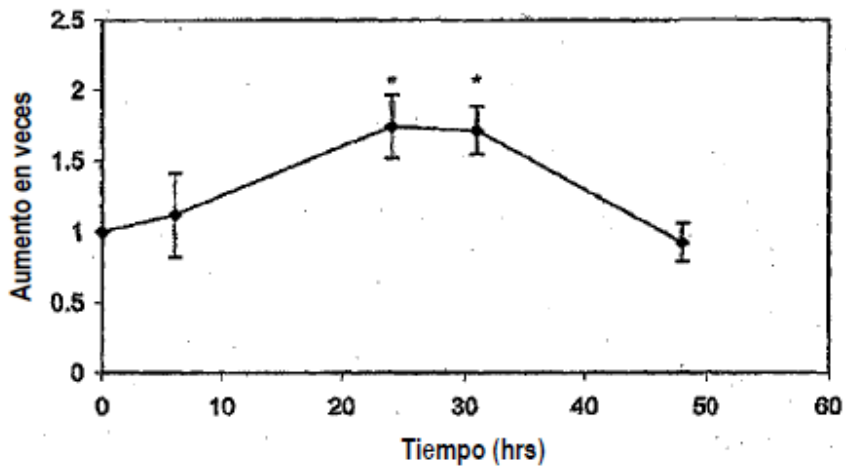


FIGURA 4

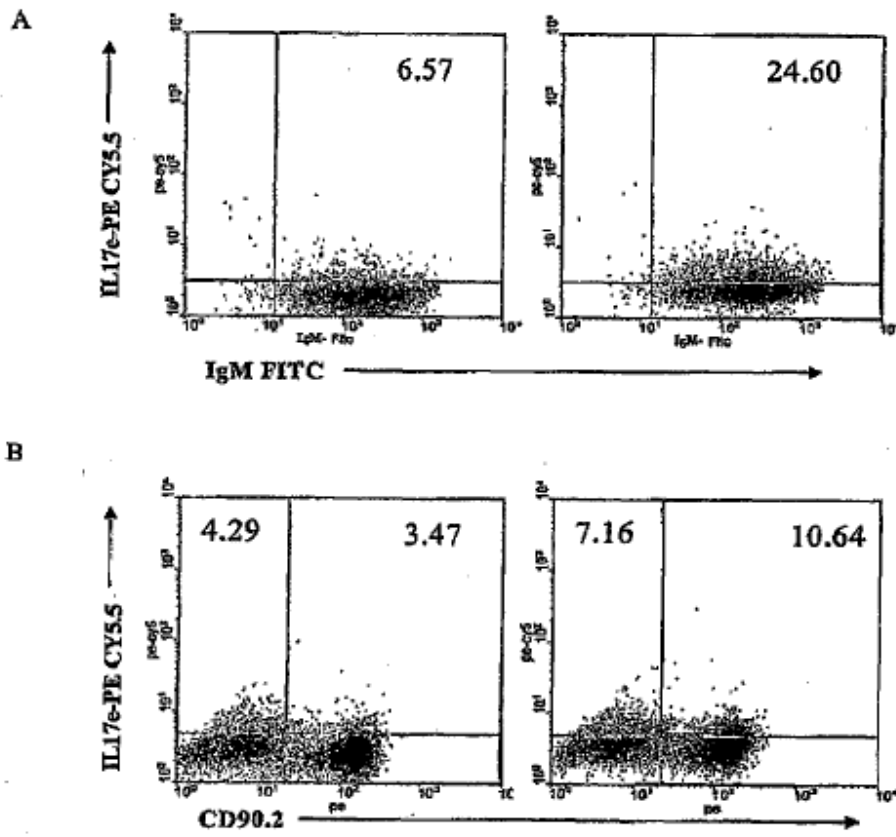


FIGURA 5

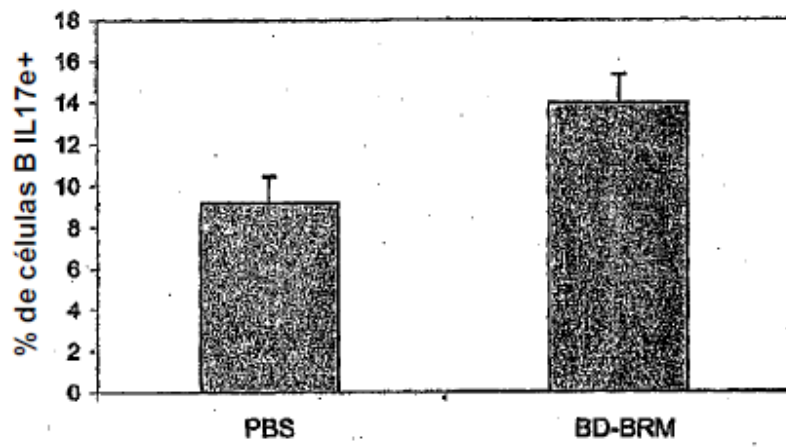


FIGURA 6

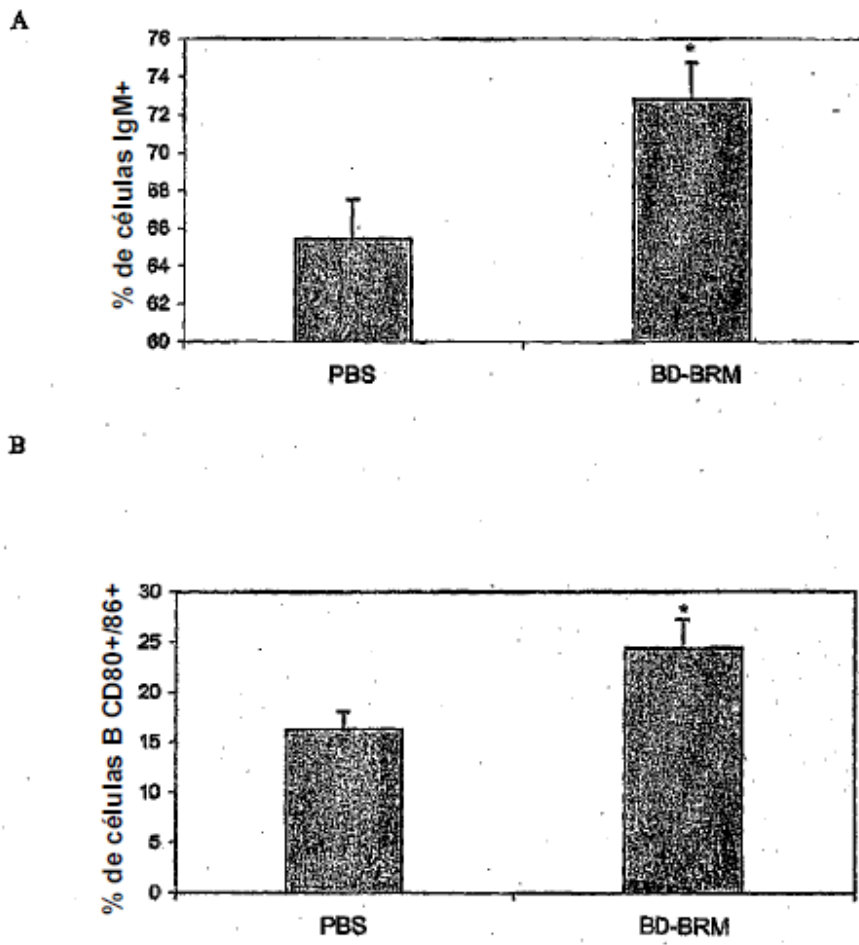


FIGURA 7

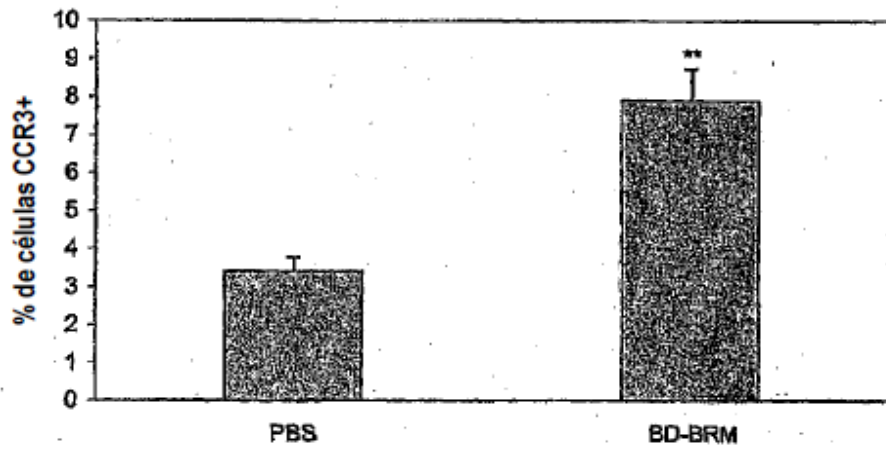




FIGURA 8

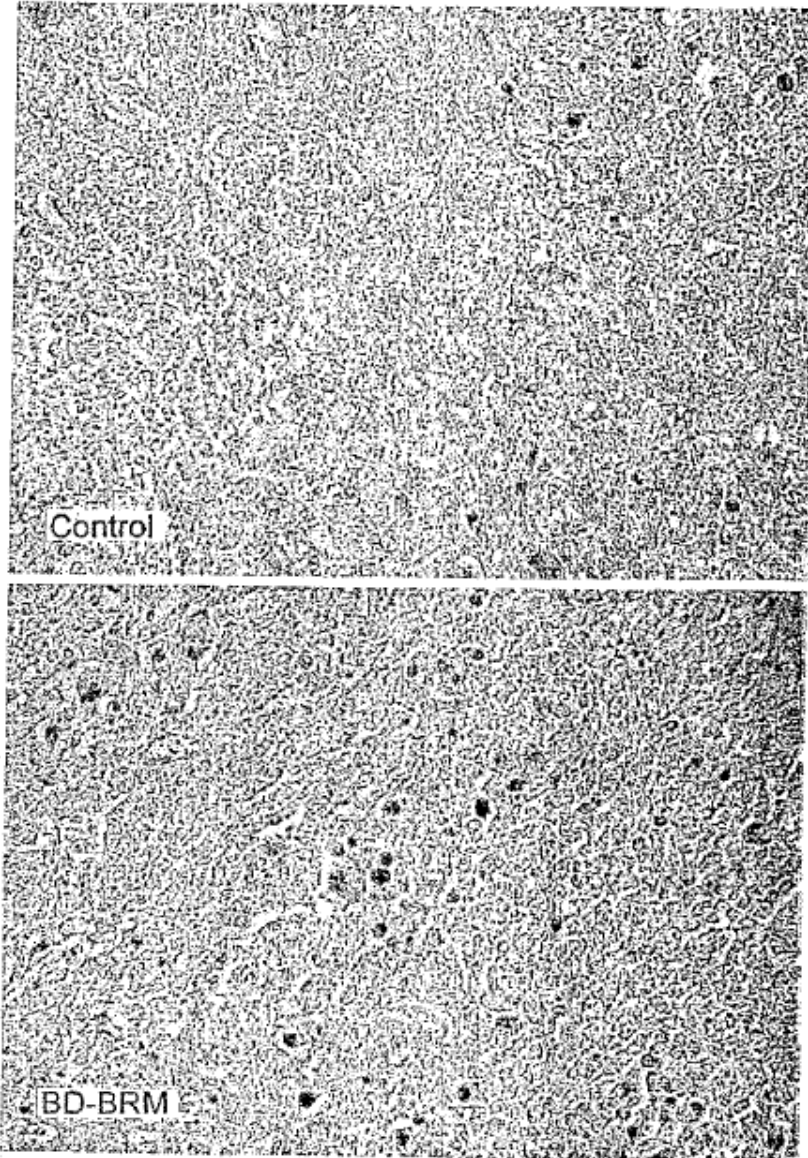


FIGURA 9

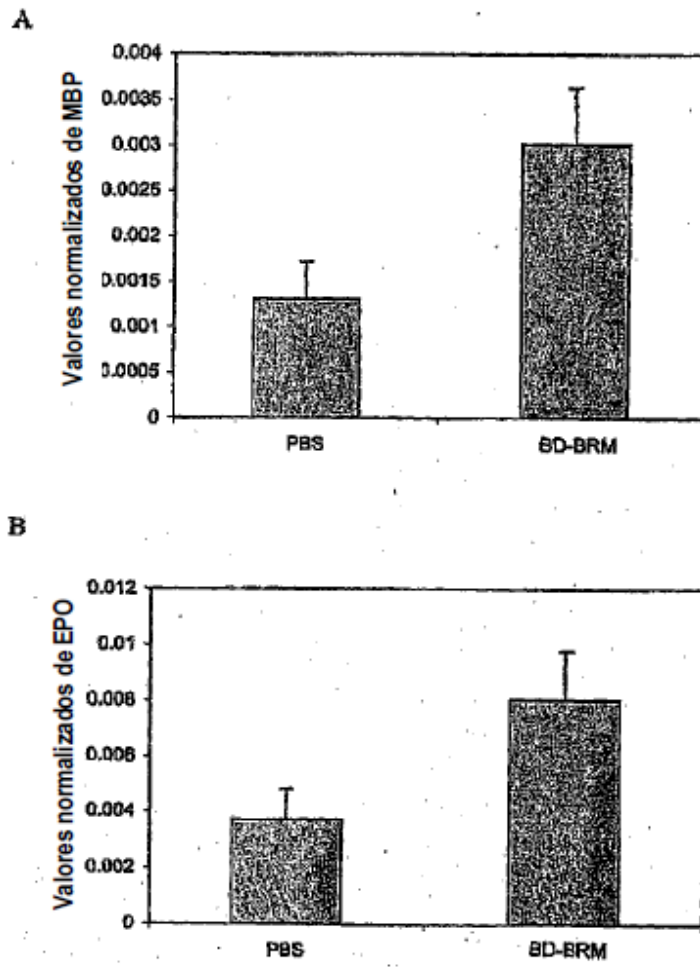


FIGURA 10

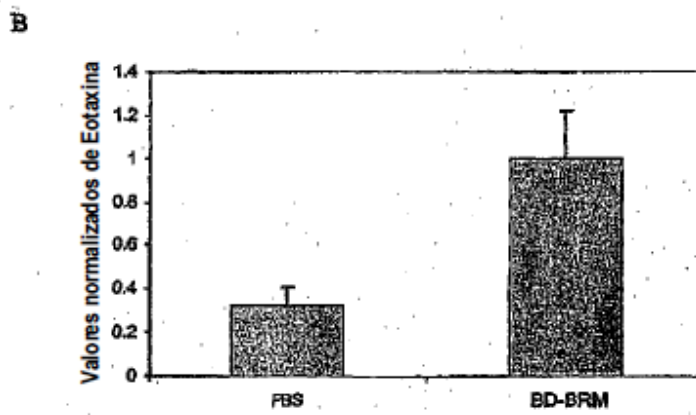
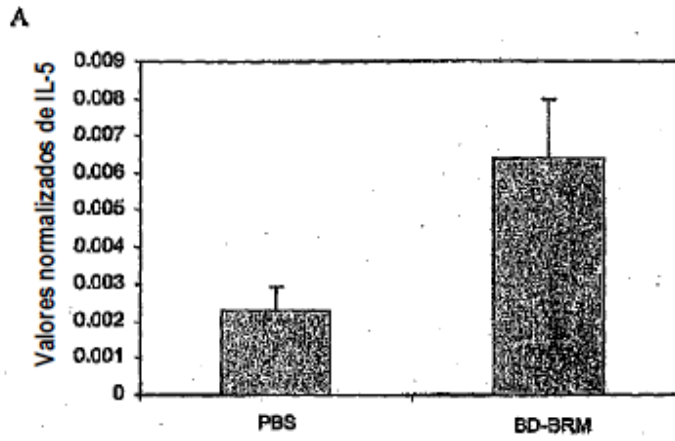


FIGURA 11

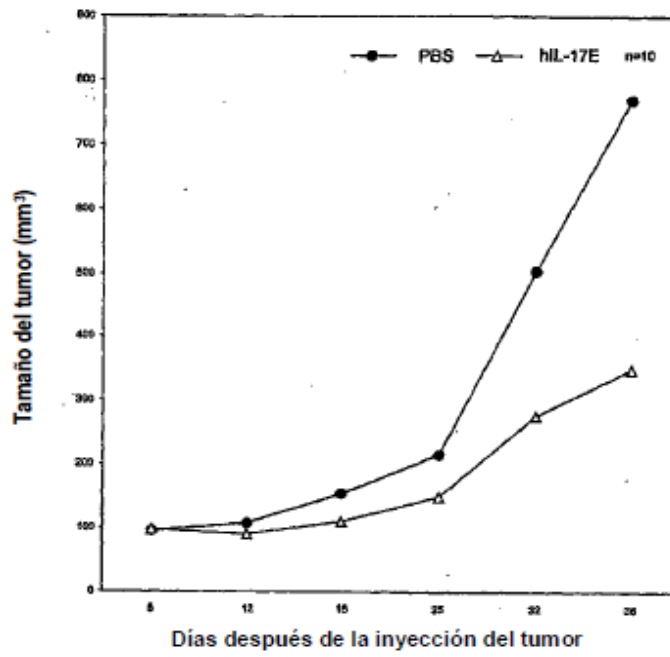


FIGURA 12a

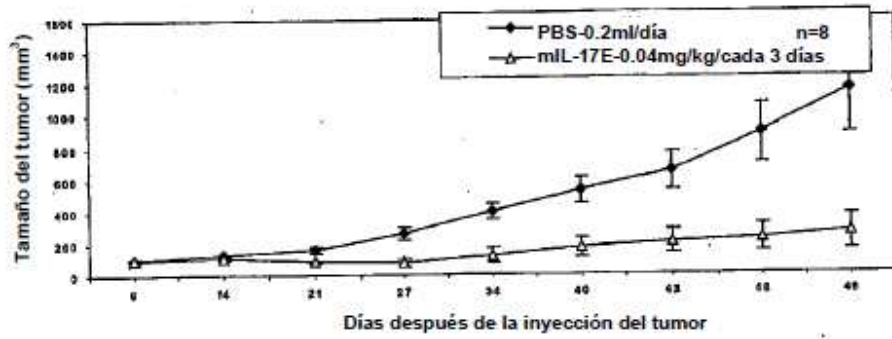


FIGURA 12b

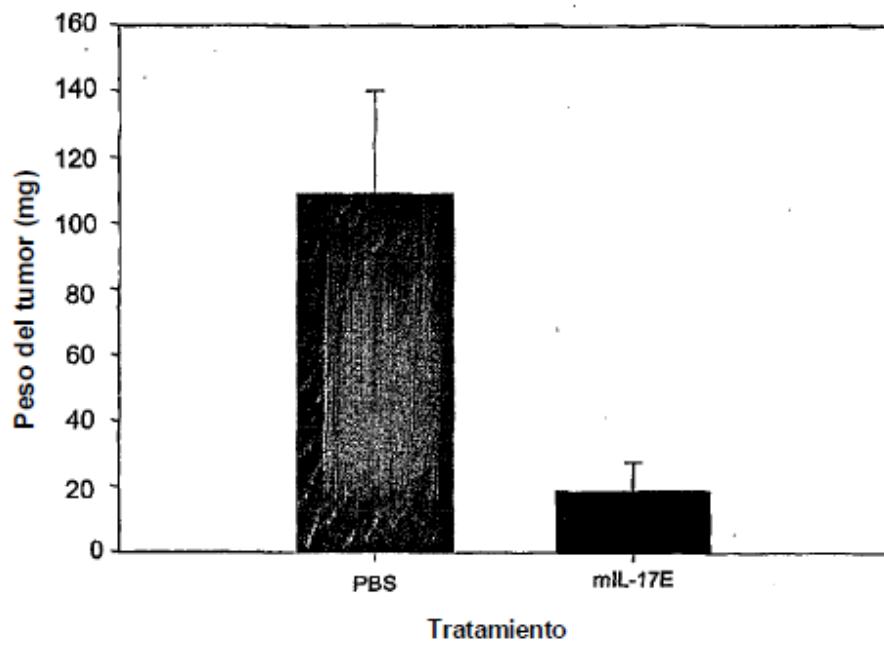


FIGURA 13

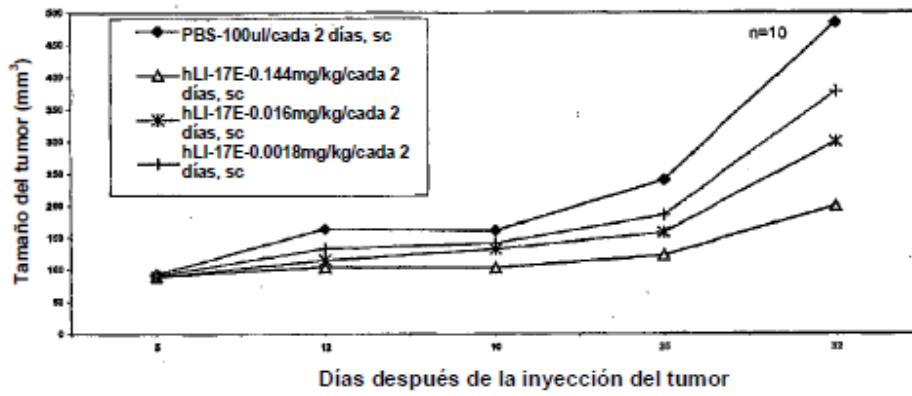


FIGURA 14a

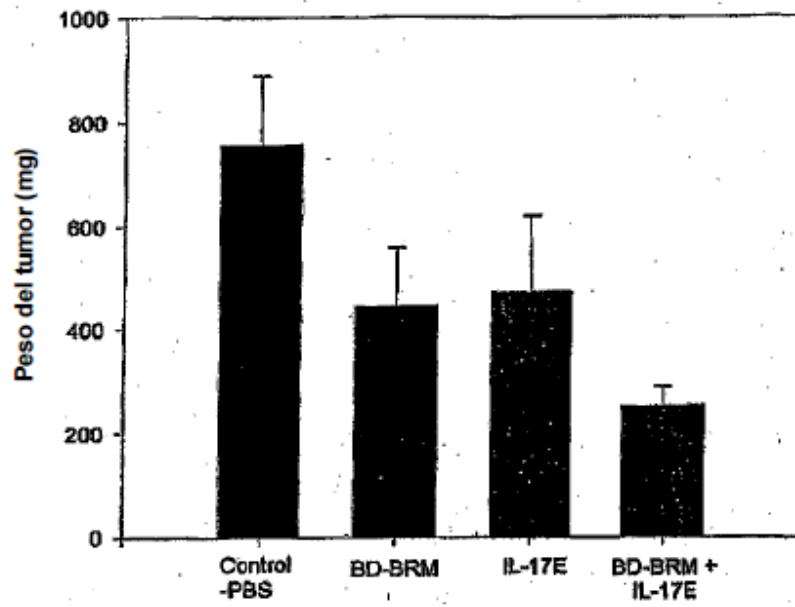




FIGURA 14b

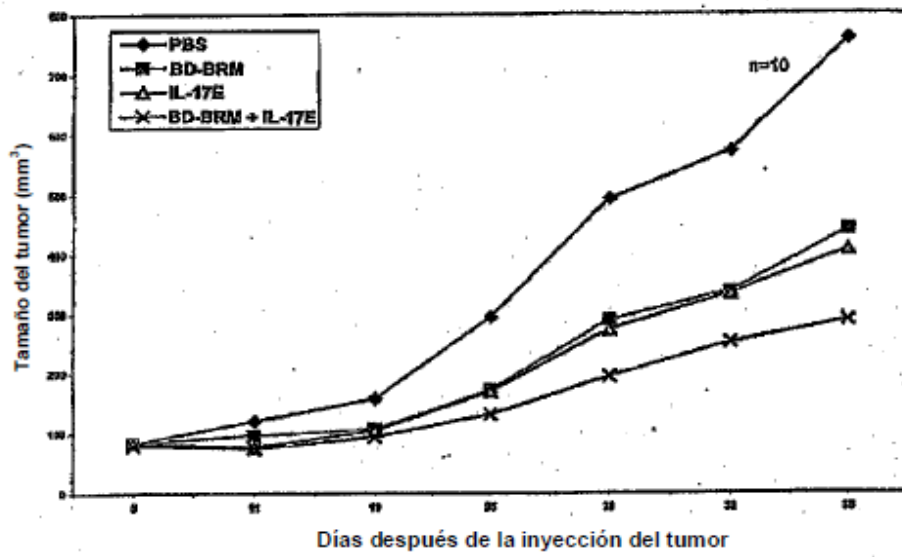


FIGURA 15

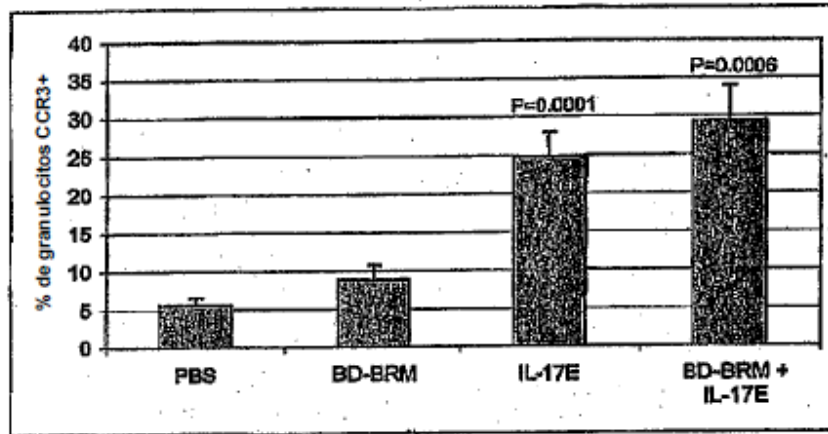


FIGURA 16

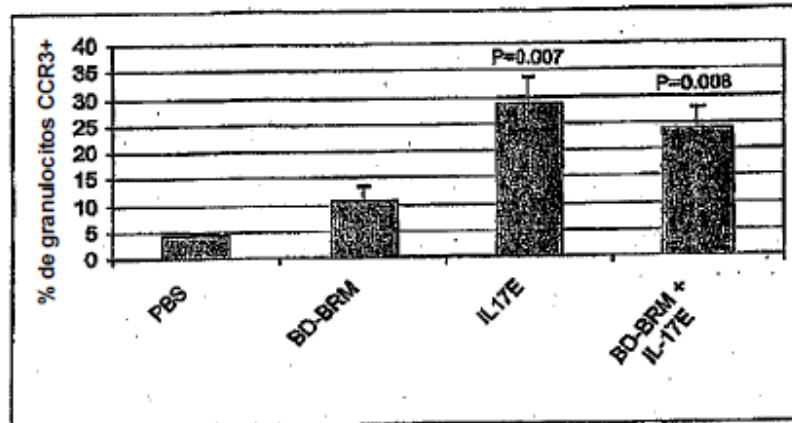


FIGURA 17

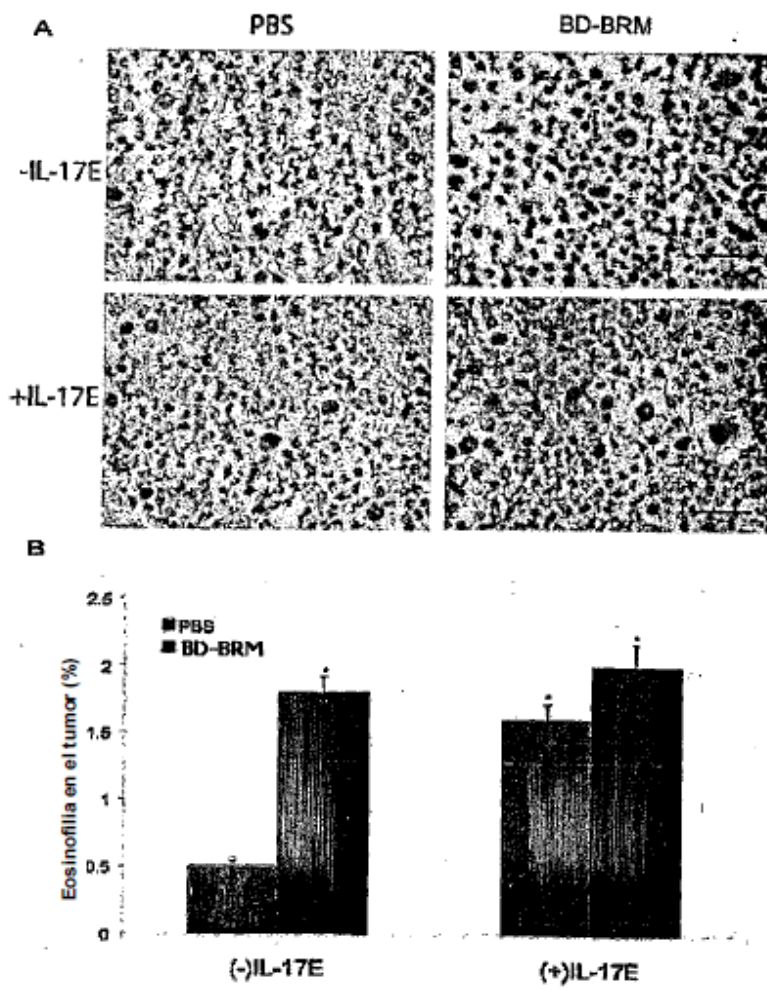


FIGURA 18a

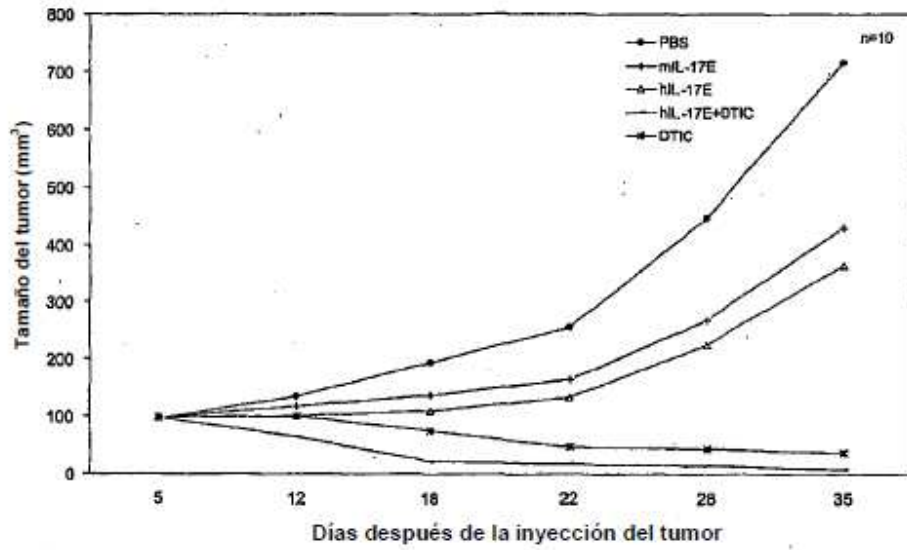


FIGURA 18b

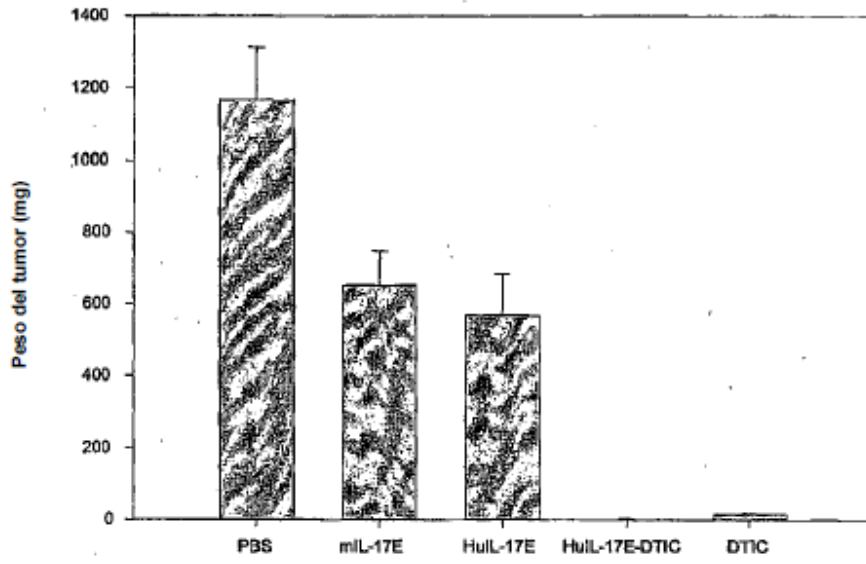


FIGURA 19

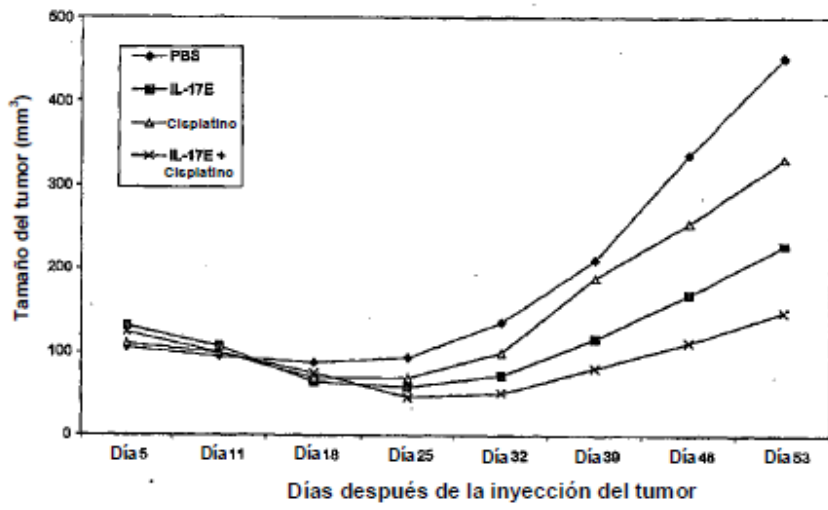


FIGURA 20a

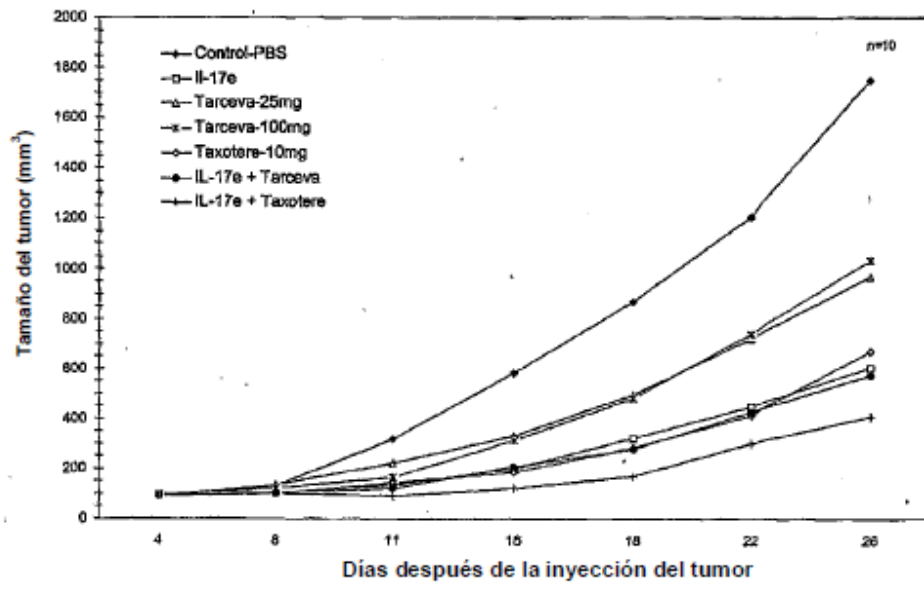




FIGURA 20b

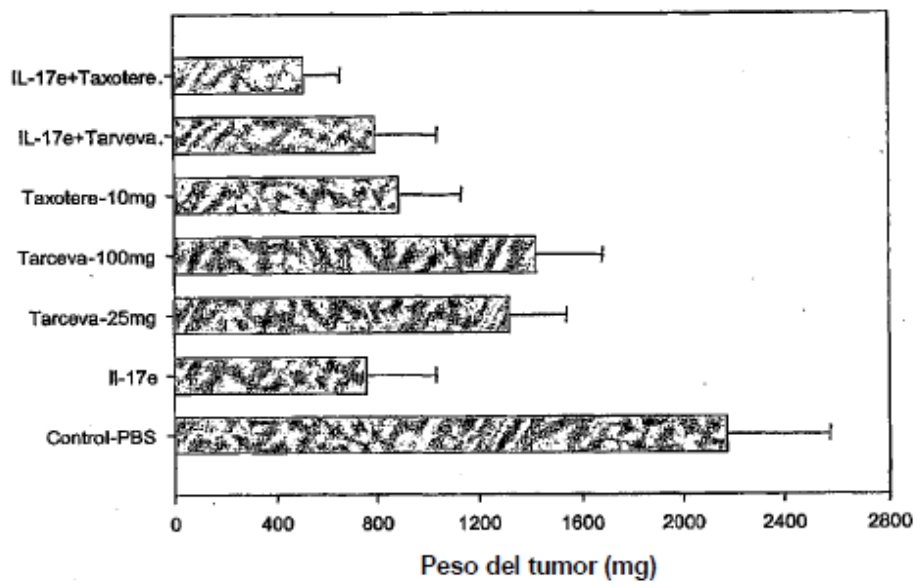


FIGURA 21a

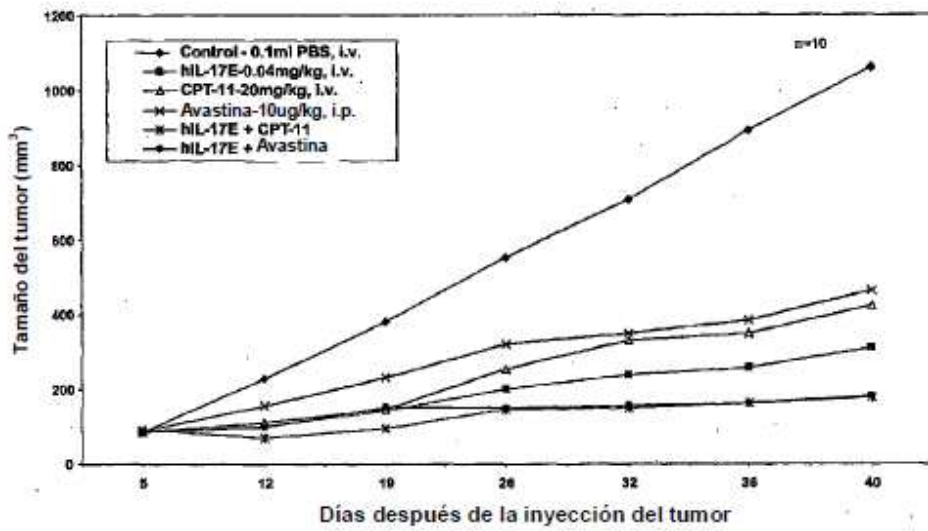


FIGURA 21b

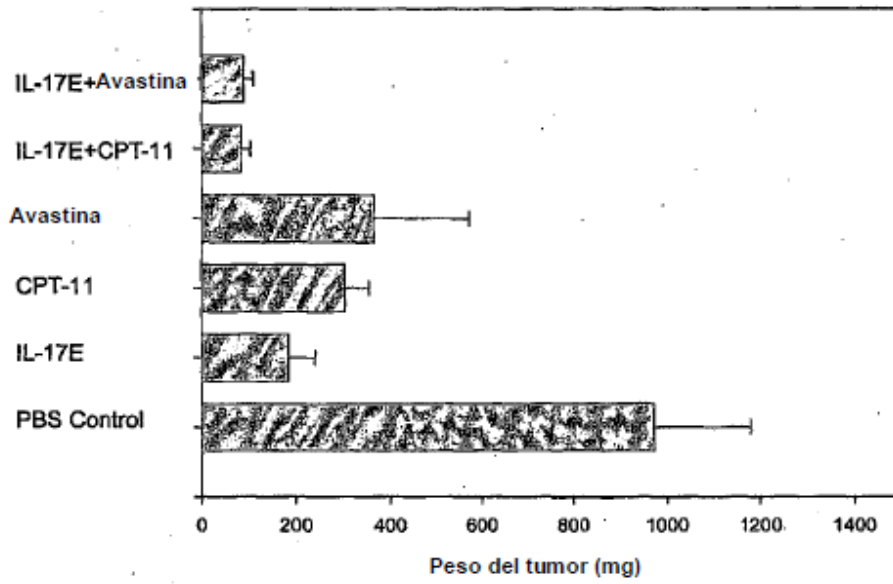


FIGURA 22

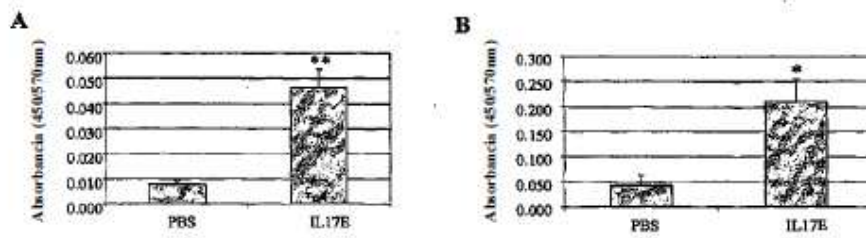


FIGURA 23

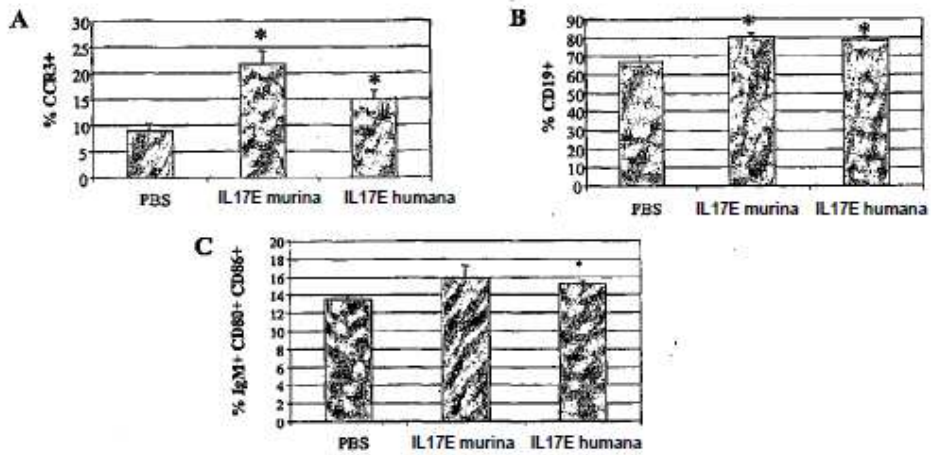


FIGURA 24

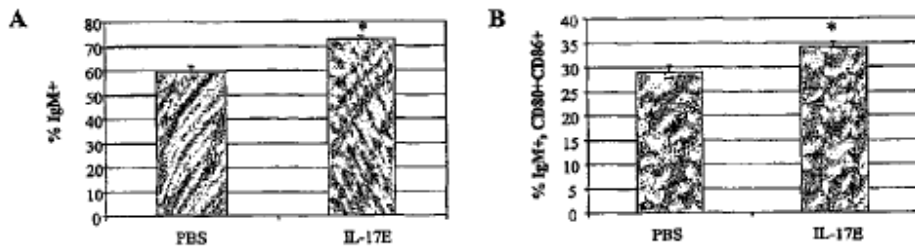
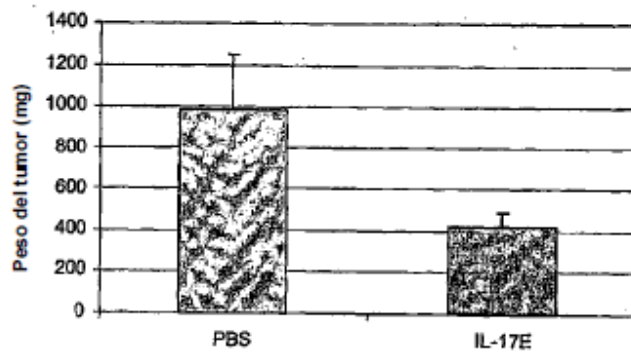


FIGURA 25

**A.**

I.P.  
IL-17E



**B.**

I.V.  
IL-17E

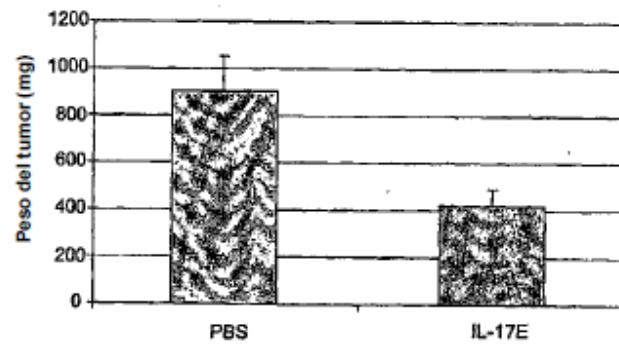


FIGURA 26

**A. IL17E humana**

**B. IL17E murina**

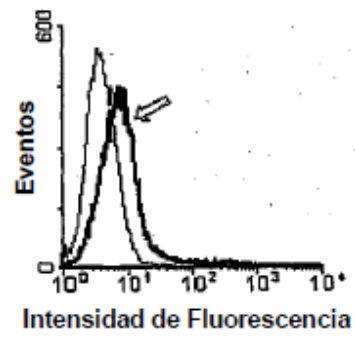
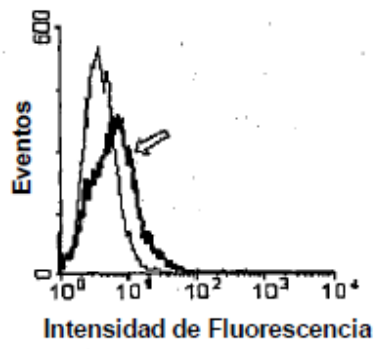


FIGURA 27a

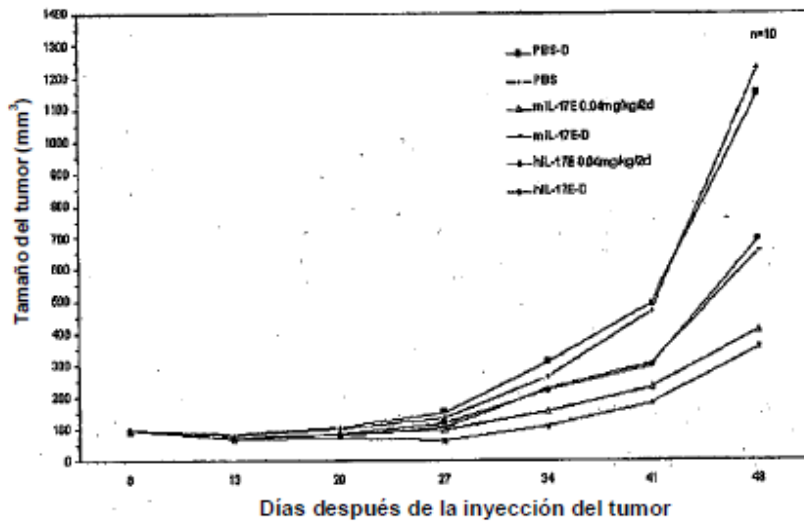




FIGURA 27b

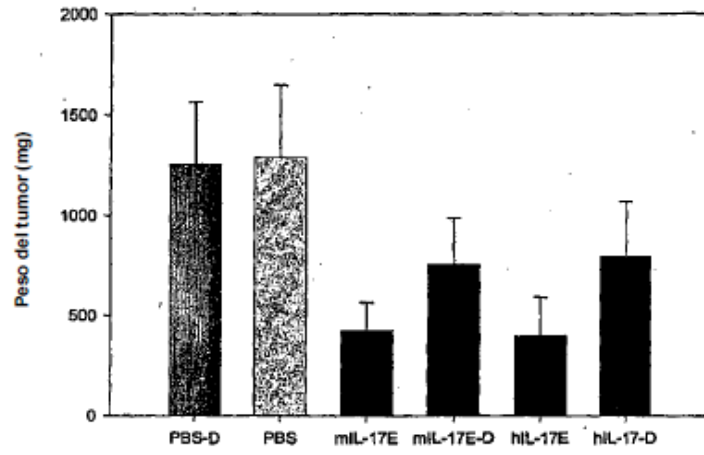


FIGURA 28

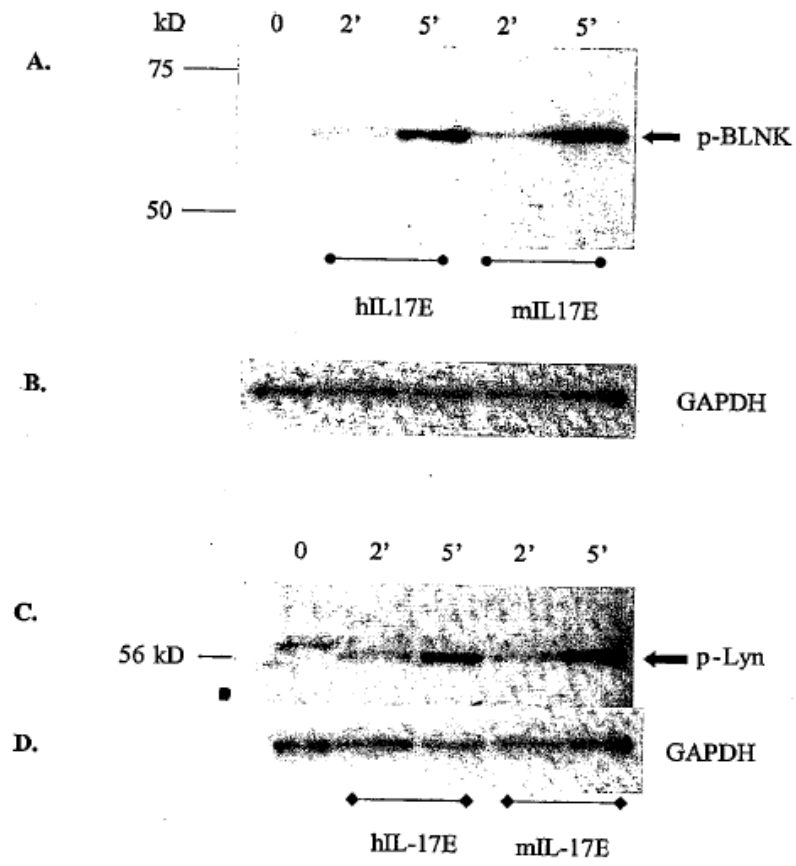


FIGURA 29

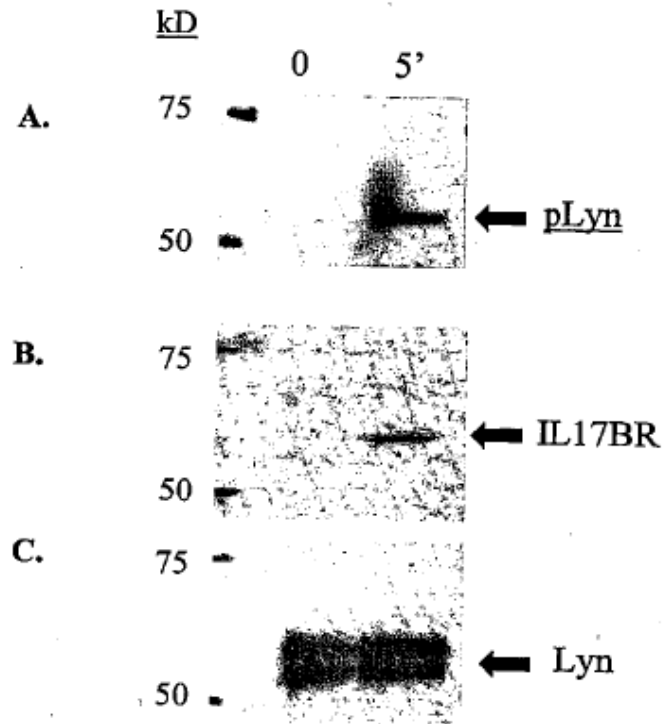


FIGURA 30

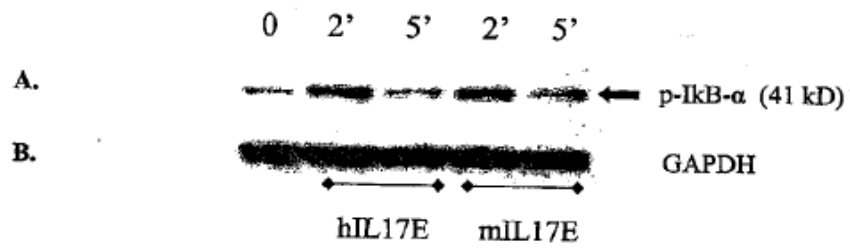


FIGURA 31

>gi|18141561|ref|NP\_542767.1|interleucina 17E [Mus musculus]

MYQAVAFAMIVGTHTVSLRIQEGCSHLPSCCPSKEQEPPEEWLKWSSASVSP  
 PEPLSHTHHAESCRASKDGPLNSRAISPWSYELDRDLNRVPQDLYHARCLCPH  
 CVSLQTGSHMDPLGNSVPLYHNQTVFYRRPCHGE  
 EGTTHRYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMA

FIGURA 32

gi|20138730|sp|Q9H293|IL17E\_HUMANA Precursor de Interleucina-17E (IL-17E)  
(Interleucina-25)(IL-25)

MRERPRLGEDSSLISLFLQVVAFLAMVMGTHYSHWPSCCPKQDTSEELL  
RWSTVPVPPLEPARPNRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDL  
YHARCLCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYC  
LERRLYRVSLACVCVRPRVMG

FIGURA 33

>gi|23600388|gb|AAN39038.1|AF461739\_1 interleucina 17E [Homo sapiens]

MYQVVAFLAMVMGTHYSHWPSCCPKQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARP  
NRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQT  
GSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLACVCV  
RPRVMG

FIGURA 34

>gi|18034676|gb|AAL57622.1|AF458059\_1 IL25 [Homo sapiens]

MYQVVAFLAMVMGTHYSHWPSCCPKQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARP  
NRHPESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQT  
GSHMDPRGNSELLYHNQTVFYRRPCHGEKGTHKGYCLERRLYRVSLACVCV  
RPRVMA

## FIGURA 35

```
>gi|18141560|ref|NM_080729.1|interleucina 17E de Mus musculus (I17e), ARNm
ATGTACCAGGCTGTTGCATTCTTGGCAATGATCGTGGGAACCCACACCGTC
AGCTTGCGGATCCAGGAGGGGCTGCAGTCACTTGCCCAGCTGCTGCCCCAG
CAAAGAGCAAGAACCCCCGGAGGAGTGGCTGAAGTGGAGCTCTGCATCT
GTGTCCCCCCCAGAGCCTCTGAGCCACACCCACCACGCAGAATCCTGCAG
GGCCAGCAAGGATGGCCCCCTCAACAGCAGGGCCATCTCTCCTTGGAGCT
ATGAGTTGGACAGGGACTTGAATCGGGTCCCCCAGGACCTGTACCACGCT
CGATGCCTGTGCCACACTGCGTCAGCCTACAGACAGGCTCCCACATGGA
CCCCTGGGCAACTCCGTCCCCTTACCACAACCAGACGGTCTTCTACCG
GCGGCCATGCCATGGTGAGGAAGGTACCCATCGCCGCTACTGCTTGGAGC
GCAGGCTCTACCGAGTCTCCTTGGCTTGTGTGTGTGTGCGGCCCCGGTCA
TGGCTTAGTCATGCTCACCACCTGCCTGAGGCTGATGCCCGGTTGGGAGA
GAGGGCCAGGTGTACAATCACCTTGCCAATGCGGGCCGGGTTCAAGCCCT
CCAAAGCCCTACCTGAAGCAGCAGGCTCCCAGGACAAGATGGAGGACTTG
GGGAGAAACTCTGACTTTTGCACTTTGGGAAGCACTTTGGGAAGGAGC
AGGTCCGCTTGTGCTGCTAGAGGATGCTGTTGTGGCATTCTACTCAGGA
ACGGACTCCAAAGCCTGCTGACCCTGGAAGCCATACTCCTGGCTCCTTTC
CCCTGAATCCCCCAACTCCTGGCACAGGCACCTTCTCCACCTCTCCCCCTT
TGCCTTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
AATGCTTGAAGGATGGTCTGAGGTGAAAGCTGTTATCGAAAGTGAAG
AGATTTATCCAAATAAACATCTGTGTTT
```

FIGURA 36

```

>gi|11878209|gb|AF305200.1|AF305200 interleucina 17E de Homo sapiens (IL17E)
ARNm, cds completo
GGCTTGCTGAAAATAAAATCAGGACTCCTAACCTGCTCCAGTCAGCCTGC
TTCCACGAGGCCTGTCAGTCAGTGCCCCGACTTGTGACTGAGTGTGCAGTGC
CCAGCATGTACCAGGTCAGTGCAGAGGGCTGCCTGAGGGCTGTGCTGAGA
GGGAGAGGAGCAGAGATGCTGCTGAGGGTGGAGGGAGGCCAAGCTGCCA
GGTTTGGGGCTGGGGGCCAAGTGGAGTGAGAACTGGGATCCCAGGGGG
AGGGTGCAGATGAGGGAGCGACCCAGATTAGGTGAGGACAGTTCTCTCAT
TAGCCTTTTCCTACAGGTGGTTGCATTCTTGCCAATGGTCATGGGAACCCA
CACCTACAGCCACTGGCCCAGCTGCTGCCCCAGCAAAGGGCAGGACACCT
CTGAGGAGCTGCTGAGGTGGAGCACTGTGCCTGTGCCTCCCCTAGAGCCT
GCTAGGCCCAACCGCCACCCAGAGTCCTGTAGGGCCAGTGAAGATGGACC
CCTCAACAGCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGACT
TGAACCGGCTCCCCCAGGACCTGTACCACGCCCGTTGCCTGTGCCCGCACT
GCGTCAGCCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCCCGGGGCAACTCGGAG
CTGCTCTACCACAACCAGACTGTCTTCTACAGGCGGCCATGCCATGGCGA
GAAGGGCACCCACAAGGGTACTGCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGTTT
CCTTAGCTTGTGTGTGTGTGCGGGCCCCGTGTGATGGGCTAGCCGGACCTGC
TGGAGGCTGGTCCCTTTTTGGGAAACCTGGAGCCAGGTGTACAACCACTT
GCCATGAAGGGCCAGGATGCCAGATGCTTGCCCTGTGAAGTGCTGTC
TGGAGCAGCAGGATCCCGGGACAGGATGGGGGGCTTTGGGGAAAACCTG
CACTTCTGCACATTTTGAAAAGAGCAGCTGCTGCTTAGGGCCGCCGGAAG
CTGGTGTCTGTCAATTTCTCTCAGGAAAGGTTTTCAAAGTCTGCCCATTT
CTGGAGGCCACCACTCCTGTCTCTTCTCTTTTCCCATCCCCTGCTACCTG
GCCAGCACAGGCACTTCTAGATATTTCCCCCTTGCTGGAGAAGAAAGA
GCCCTGGTTTTATTGTTTGTACTCATCACTCAGTGAGCATCTACTTTG
GGTGCATTCTAGTGTAGTTACTAGTCTTTTGACATGGATGATTCTGAGGAG
GAAGCTGTTATTGAATGTATAGAGATTTATCCAAATAAATATCTTTATTTA
AAAATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

FIGURA 37

>gi|23600387|gb|AF461739.1|ARNm de la interleucina 17E (IL17E) de Homo sapiens, cds completo  
CTCAAGTCACTCCCTAAAAAGACAGTGGAAATAAAATTTGAATAAACAAAA  
CAGGCTTGCTGAAAATAAAATCAGGACTCCTAACCTGCTCCAGTCAGCCT  
GCTTCCACGAGGCCTGTCAGTCAGTGCCCCACTTGTGACTGAGTGTGCAGT  
GCCCAGCATGTACCAGGTGGTTGCATTCTTGGCAATGGTCATGGGAACCC  
ACACCTACAGCCACTGGCCAGCTGCTGCCCCAGCAAAGGGCAGGACACC  
TCTGAGGAGCTGCTGAGGTGGAGCACTGTGCCTGTGCCTCCCCTAGAGCC  
TGCTAGGCCCAACCGCCACCCAGAGTCTGTAGGGCCAGTGAAGATGGAC  
CCCTCAACAGCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGAC  
TTGAACCGGCTCCCCAGGACCTGTACCACGCCCGTTGCCTGTGCCCGCAC  
TGCGTCAGCCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCCCGGGGCAACTCGGA  
GCTGCTTACCACAACCAGACTGTCTTCTACCGGCGGCCATGCCATGGCG  
AGAAGGGCACCCACAAGGGCTACTGCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGT  
TCCTTAGCTTGTGTGTGTGCGGCC GTGTGATGGGCTAG

FIGURA 38

>gi|18034675|gb|AF458059.1|AF458059 ARNm de la IL25 de Homo sapiens, cds completo  
ATGTACCAGGTGGITGCATTCTTGGCAATGGTCATGGGAACCCACACCTA  
CAGCCACTGGCCCAGCTGCTGCCCCAGCAAAGGGCAGGACACCTCTGAGG  
AGCTGCTGAGGTGGAGCACTGTGCCTGTGCCTCCCCTAGAGCCTGCTAGG  
CCCAACCGCCACCCAGAGTCTGTAGGGCCAGTGAAGATGGACCCCTCAA  
CAGCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGACTTGAACC  
GGTCCCCCAGGACCTGTACCACGCCCGTTGCCTGTGCCCGCACTGCGTCA  
GCCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCCCGGGGCAACTCGGAGCTGCTC  
TACCACAACCAGACTGTCTTCTACCGGCGGCCATGCCATGGCGAGAAGGG  
CACCCACAAGGGCTACTGCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGTTCCTTGG  
CTGTGTGTGTGTGCGGCCCGGGTCATGGCTTAG